

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



**Bc. Julie Böhmová**

Fylogeneze a evoluce čeledi Megastigmidae (Hymenoptera: Chalcidoidea)  
Phylogeny and evolution of the family Megastigmidae (Hymenoptera: Chalcidoidea)

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Janšta, Ph.D.

Praha, 2020



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 10. 8. 2020

Bc. Julie Böhmová



## **Poděkování**

Mé poděkování patří rozhodně ze všeho nejvíc mému školiteli Petru Janšovi za nekonečnou trpělivost, laskavost, nápomocnost a jeho cenné rady a připomínky. Dále pak díky patří zejména Kristýně Bubeníkové za pevné nervy při zaučování v laboratoři a při zodpovídání mých dotazů. Děkuji J.-Y. Rasplusovi, Astrid Cruaud a Sabine Nidelet za poskytnutí nedocenitelného mentoringu, materiálu a zázemí při získávání a zpracování dat v laboratoři CBGP (Montferrier sur Lez, Francie). Za materiál bych chtěla poděkovat též následujícím: Garymu Taylorovi (University of Adelaide a South Australian Museum – Adelaide, Austrálie), Larsovi Krogmannovi (Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart – Německo), Kazunori Matsuovi (Biosystematics Laboratory, Faculty of Social and Cultural Studies, Kyushu University – Fukuoka, Japonsko), Lubomíru Masnerovi (Canadian National Collection of Insects – Ottawa, Kanada), Susan Wright (Queensland Museum – Brisbane, Austrálie) a kurátorům Canberra Australian National Insect Collection (Canberra, Austrálie). V neposlední řadě děkuji mé rodině a přátelům za psychickou podporu a zejména pak Ondrovi.

Tento výzkum je podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK) – č. 1122218.

## Abstrakt

Čeleď Megastigmidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), jedna z čeledí blanokřídlých parazitoidů, je zcela unikátní tím, že zahrnuje i mnoho druhů s fytofágní výživou larev. Mnoho zástupců různých rodů je totiž semenožravých a rod *Bortesia* je dokonce schopný vytvářet háčky. Čeleď Megastigmidae je rozšířena zejména v australské oblasti, ale několik rodů/druhových skupin se vyskytuje také v jiných oblastech, především v orientální a holarktické. Hlavním cílem práce bylo zmapovat fylogenetické vztahy mezi jednotlivými rody a objasnit, kolikrát zde došlo k přechodu mezi parazitoidním a fytofágním způsobem života, co je původní potravní strategií čeledi, jakým způsobem se vyvíjely strategie u rodu *Megastigmus* a jaký je geografický původ čeledi. Otázky byly testovány na základě fylogeneze sestavené pomocí jedné z nejnovějších metod – sekvenace tzv. „ultraconserved elements (UCEs)“ – a to s využitím 100 zástupců čeledi Megastigmidae v 11 z 12 dosud platných rodů vybraných s přihlédnutím k potravní strategii a biogeografii jednotlivých druhů. Finální dataset obsahuje celkem 1210 lokusů v délce cca 570.000 párů bazí a většina uzlů je podpořena bootstrapem 100. Výsledky ukazují, že čeleď lze rozdělit na tři hlavní linie. Jedna je tvořena větví s pravděpodobně fytofágními druhy (včetně háčkotvorných) a větví s neznámou strategií. Další zahrnuje nejspíš pouze parazitoidní druhy. V rámci třetí větve došlo ke vzniku fytofágie alespoň dvakrát nezávisle na sobě. Původní strategií čeledi byl zřejmě parazitoidismus. Stejně tak byl parazitický předek rodu *Megastigmus*, ve kterém došlo k přeskoku na krytosemenné a následně i nahosemenné rostliny. Výsledné fylogenetické hypotézy rovněž poukazují na australský původ čeledi, nicméně s opakovaným šířením do jiných částí světa. V neposlední řadě je zřejmé, že celá skupina vyžaduje kompletní taxonomickou revizi rodů a druhových skupin a celkové prohloubení o znalostí o jejich potravní ekologii.

**Klíčová slova:** *Megastigmus*, Megastigmidae, Chalcidoidea, fytofágie, parazitoid, evoluce potravních strategií

## Abstract

The family Megastigmidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), one of the hymenopteran parasitoid families, is unique in containing many species with phytophagous larval feeding strategy. A number of species of different genera are seed-feeders and the genus *Bortesia* is even capable of inducing galls. The family Megastigmidae is found mainly in the Australian region but a few genera/species groups are widespread throughout different areas, mainly in the Oriental and the Holarctic region. The main goal of this study was to map phylogenetic relationships among genera and clarify the following: the overall number of transitions between a parasitoid and a phytophagous way of life, the ancestral feeding strategy of the family, the evolution of feeding strategies in the genus *Megastigmus*, and the geographical area of origin of the family. The questions were tested based on a phylogeny reconstructed by a state-of-the-art method – sequencing of “Ultra-Conserved Elements (UCEs)” – using 100 specimens of Megastigmidae from 11 out of 12 currently valid genera selected taking into consideration their feeding strategy and biogeographical origin. The final dataset contains 1210 loci (570,000 base pairs in length) and most nodes are supported by bootstrap value 100. The results show that the family can be divided into 3 clades. The first clade consists of a lineage probably formed entirely by phytophagous species (including gall-formers) and a lineage with an unknown biology. The second clade includes very likely only parasitoid species. Within the third clade, phytophagy evolved at least twice independently. Parasitoidism was most likely the original feeding strategy of the family. It also appears to have been the ancestral strategy of the genus *Megastigmus* but with a subsequent shift to seed predation of angiosperms and later gymnosperms. The final phylogenetic hypotheses support an Australian origin of the family (with repeated colonization of other parts of the world). Finally, it is obvious that the whole family needs a complete taxonomic revision of its genera and species groups and requires a general deepening of the knowledge about their feeding strategies.

**Keywords:** *Megastigmus*, Megastigmidae, Chalcidoidea, phytophagy, parasitoid, evolution of feeding strategies

## Obsah

1) Úvod .....	1
2) Literární přehled.....	2
a) Fytofágie v rámci Hymenoptera.....	2
b) Megastigmidae.....	4
i. Morfologie .....	4
ii. Fylogenetické postavení Megastigmidae v rámci Chalcidoidea.....	4
iii. Přehled rodů čeledi Megastigmidae, jejich rozšíření a biologie .....	5
c) Ultraconserved elements (UCEs) .....	14
3) Cíle .....	18
4) Materiál a metodika.....	19
a) Materiál .....	19
b) Molekulární metody.....	20
i. Izolace DNA .....	20
ii. Kvantifikace DNA.....	21
iii. DNA „shearing“ (fragmentace DNA) a rekoncentrace .....	21
iv. Oprava nezarovnaných konců fragmentů a adenylace 3'-konců .....	22
v. Ligace adaptérů .....	22
vi. Purifikace, odstranění dimerů adaptérů .....	23
vii. Amplifikace DNA pomocí PCR.....	23
viii. Kvantifikace, ekvimolární „pooling“ a rekoncentrace .....	23
ix. Hybridizace, zachycení („capture“) UCEs, PCR zachycených knihoven .....	24
x. Kvantifikace a finální „pooling“ .....	24
c) Analýza dat.....	26
i. Čištění a kontrola kvality molekulárních dat .....	26
ii. Fylogenetická analýza .....	26
iii. Mapování biologických a biogeografických dat.....	27
5) Výsledky .....	28
a) Fylogeneze čeledi Megastigmidae.....	28



b) Potravní strategie .....	31
c) Geografický původ .....	35
6) Diskuze .....	38
a) Aplikace UCE metody .....	38
b) (Staro)nové poznatky o fylogenezi čeledi Megastigmidae .....	38
c) Evoluce potravních strategií.....	41
d) Geografický původ .....	44
7) Závěr.....	46
8) Literatura.....	47
9) Dodatky.....	55



## 1) Úvod

Nadčeď Chalcidoidea (chalcidky) je druhově, morfologicky a biologicky neuvěřitelně rozmanitá skupina řádu Hymenoptera, jejíž zástupci jsou většinou známí jako parazitoidi nejrůznějších taxonů a stádií hmyzu a jiných bezobratlých (Heraty et al. 2013, Munro et al. 2011). Celá nadčeď čítá přes 22 500 popsáných zástupců a obsahuje 23 v současnosti žijících čeledí a dvě čeledi vymřelé (Noyes 2020). Jejich skutečná diverzita však bude pravděpodobně ještě mnohem vyšší (Heraty et al. 2013).

Čeď Megastigmidae je však nejen v rámci této nadčeďi, ale i mezi ostatním blanokřídlym parazitickým hmyzem (*Parasitoida sensu* Peters et al. 2017) unikátní. Mimo parazitoidních druhů, jejichž larvy parazitují převážně v hálkách bejlomerek (Diptera: Cecidomyiidae) a žlabatek (Hymenoptera: Cynipidae), obsahuje totiž spoustu druhů s fytofágní výživou larev rámci různých rodů (Bouček 1988a, Grissell 1995, Janšta et al. 2018). Dokonce se minimálně v jednom případě (rod *Bortesia*\*) u nich vytvořila schopnost produkovat hálky (Riek 1966). Primární potravní strategie této čeledi je však stále předmětem diskuze. Není jasné, zda je původní strategií fytofágie nebo parazitoidismus (Grissell 1995 vs. Janšta et al. 2018).

Nejvíce rodů a druhů čeledi Megastigmidae najdeme v australské oblasti (Bouček 1988a, Grissell 1999, Kamijo 1962). Její zástupci jsou však také hojně rozšířeni v holarktické oblasti, především na semenech různých jehličnanů. Někteří z nich dokonce představují ekonomicky závažné škůdce (Auger-Rozenberg et al. 2006, Grissell 1999, Roques & Skrzypczyńska 2003).

V současnosti čeď obsahuje cca 200 druhů ve 12 rodech (Janšta et al. 2018, Noyes 2020). Jediná existující podrobnější fylogenetická studie (Janšta et al. 2018) však zahrnovala pouze 7 z 12 rodů a navíc hlubší uzly získaného fylogenetického stromu neměly dostatečnou podporu. Dosud tedy neexistuje žádná dobře podpořená fylogenetická analýza zahrnující všechny rody či druhové linie, díky které by bylo možné podrobněji testovat evoluci čeledi.

\*Pozn.: Seznam druhů a rodů čeledi Megastigmidae (včetně autora popisu, biologie a geografie) je uveden v Příloze 1.

## 2) Literární přehled

### a) Fytofágie v rámci Hymenoptera

V rámci druhově mimořádně bohatého řádu blanokřídlých (Hymenoptera) je fytofágie považována za původní potravní strategii larev (Peters et al. 2017). Býložravost nacházíme u většiny taxonů spadajících do parafyletické skupiny tradičně označované jako širopasí (Symphyta) v podobě žíru na povrchu rostlin, žíru v dřevnatém materiálu či jako tvorbu hálek (Sharkey 2007, Whitfield 2003).

U společného předka skupiny Orussoidea a štíhlopasých (Apocrita) pak došlo k přechodu z fytofágie na parazitoidismus na xylofágních larvách (Heraty et al. 2011, Peters et al. 2017). Právě parazitoidismus posléze vedl k nesmírné druhové radiaci skupin v rámci Apocrita (Peters et al. 2017) a je nejčastější potravní strategií u blanokřídlého hmyzu (Klopfstein et al. 2013).

Další změny v potravních strategiích larev byly spíše výjimečné a k sekundárnímu návratu k fytofágii u larev docházelo pouze vzácně. V rámci skupiny Apocrita: Aculeata pouze dvakrát, a to u medovos (Vespidae: Masarinae) a u včel (Anthophila) v podobě sběru pylu či nektaru (Peters et al. 2017).

U skupiny Apocrita: Parasitoida (*sensu* Peters et al. 2017) se fytofágie jako sekundární potravní strategie nachází například u žlabatek (Cynipoidea: Cynipidae). Tato bohatě diverzifikovaná čeleď, kde je většina zástupců buď hálkotvorných nebo inkvilinních – živí se pletivy hálky, ale sami ji nevytváří – je považována za vůbec druhově nejbohatší skupinu s fytofágními larvami v rámci Parasitoida (Ronquist 1999, Ronquist & Liljeblad 2001). Obecně se uvádí, že příslušníci čeledi Cynipidae jsou vázaní na určitý hostitelský rod rostlin (Askew et al. 2006), někdy dokonce na konkrétní druh nebo skupinu druhů (Ronquist & Liljeblad 2001). Řadí se tedy mezi nejvíce hostitelsky specializované skupiny hmyzu (zejména pak tribus Cynipini). Náročnost manipulace s hostitelskou rostlinou k vytvoření hálky, a tedy i nutnost koevoluce, je totiž natolik komplikovaná, že zpravidla ani neumožňuje hostitelský generalismus. Druhy napadající širší spektrum hostitelů byly zaznamenány pouze výjimečně (Ronquist & Liljeblad 2001, Stone et al. 2009).

Dále se s úplným přechodem k fytofágii u skupiny Parasitoida můžeme setkat u tzv. fíkových vosiček (Chalcidoidea: Agaonidae). Její zástupci si osvojili schopnost vytvářet hálky ze semeníků fíků (Moraceae – morušovníkovité), ve kterých se vyvíjí jejich larvy. Tato potravní strategie s sebou u mnoha druhů fíkových vosiček nese často výrazné morfologické

adaptace dospělců, které jen upevňují tento mutualistický vztah mezi opylovačem a hostitelem (Cruaud et al. 2012).

Ovšem tyto výše zmíněné přechody se u *Parasitoida* vždy týkají jednak odvozeného typu fytofágie (tj. vytváření hálek) a zároveň celých velkých skupin, kde ke vzniku adaptací došlo už v časně evoluci skupiny u společného předka daného taxonu (Peters et al. 2017). Proto vystopovat konkrétní evoluční příčiny a konsekvence sekundárního vzniku fytofágie je již velmi obtížné.

U parazitických skupin blanokřídlých však známe i mnoho pravděpodobně mladších přechodů k fytofágii v rámci jednotlivých parazitických skupin. Konkrétně se jedná například o několik druhů čeledí *Braconidae* a *Ichneumonidae* (oba *Ichneumonoidea*), kde k přechodu k fytofágii došlo prokazatelně několikrát nezávisle na sobě u odvozených taxonů (Flores et al. 2005, Chavarría et al. 2009, de Macêdo & Monteiro 1989, Periotto et al. 2011, Zaldívar-Riverón et al. 2007 a 2014).

Z evolučního hlediska se jeví velmi zajímavá také nadčeď *Chalcidoidea*, kde došlo k nejvíce přeskokům mezi způsoby larvální vyživy. Původní potravní strategií celé nadčeledi je parazitoidismus (Heraty et al. 2013, Munro et al. 2011), avšak v různých liniích se nachází druhy s entomofytofágním nebo čistě fytofágním (predátoři semen nahosemenných i krytosemenných rostlin nebo hálkotvorné druhy či jejich inkvilíni) způsobem vývoje larev. Mimo čeď *Agaonidae*, kde, jak už bylo zmíněno výše, téměř všechny dosud známé druhy vytváří háčky v semenících fíků (Cruaud et al. 2012), nacházíme tyto rozličné strategie tu a tam i v dalších skupinách chalcidek. Konkrétně se s přechodem k fytofágii či entomofytofágii setkáváme i mezi čeleděmi jako *Eulophidae*, *Eurytomidae*, *Megastigmidae*, *Ormyridae*, *Pteromalidae*, *Tanaostigmatidae* a *Torymidae* (Gómez et al. 2017, Heraty et al. 2013, Janšta et al. 2018). Čeď *Tanaostigmatidae* je celá fytofágní (La Salle 2005).

Avšak hostitelé mnoha druhů chalcidek, jakožto druhově velmi početné nadčeledi, nejsou dodnes vůbec známi a přechody mezi různými potravními strategiemi lze u většiny čeledí jen těžko hodnotit (Heraty et al. 2013). Nicméně minimálně jedna z výše jmenovaných čeledí, čeď *Megastigmidae*, se ke studiu přechodů mezi parazitoidismem a jednotlivými typy fytofágií nabízí.

## b) Megastigmidae

### i. Morfologie

Tato čeleď získala své jméno podle u většiny druhů vysoce nápadného velkého oválného až kulovitého stigma (silně zvětšená a pigmentovaná oblast pod stigmální žilkou a případně v jejím okolí na předním páru křídel), které je zpravidla o něco vyšší než širší. U druhů s menším stigmatem se vyskytuje stigmální žilka o něco delší než u druhů s rozměrnějším stigmatem. Stigmální žilka je vždy vyvinuta a většinou orientovaná v pravém úhlu k marginální žilce. Marginální žilka je často kratší než postmarginální (Bouček 1988a, Grissell 1995, Janšta et al. 2018).

Oproti většině chalcidek mají tělo buď bez kovového lesku, většinou nažloutlé s více či méně početnými tmavými oblastmi, nebo kovově lesklé. Výjimečně se vyskytují taxony s kombinací těchto barevných vzorů. Clypeus je tvořen dvěma laloky či jedním zubem/výběžkem. Okcipitální lišta je vždy přítomna. Hlava a dorzální část mesosoma se vyznačuje pouze malým množstvím většinou tmavých, silných a pravidelně uspořádaných sít. Kyčle jsou relativně krátké (Bouček 1988a, Grissell 1995, Janšta et al. 2018). Další morfologické charakteristiky jsou podrobně popsány např. v Roques & Skrzypczyńska (2003).

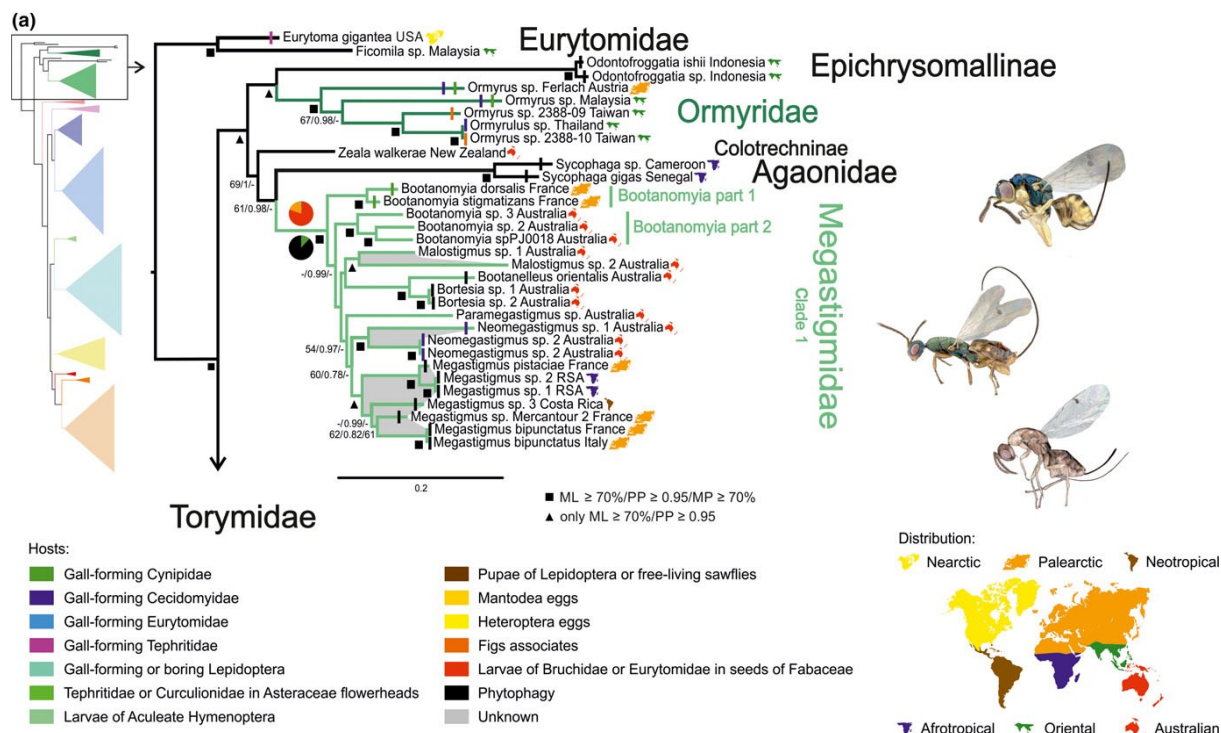
### ii. Fylogenetické postavení Megastigmidae v rámci Chalcidoidea

Názory na postavení čeledi Megastigmidae v rámci nadčeledi Chalcidoidea se v průběhu posledních let vyvíjely a upřesňovaly. Čeleď Megastigmidae byla dříve považována za podčeleď čeledi Torymidae, nicméně toto tvrzení bylo podpořeno pouze morfologickými znaky dospělců (Grissell 1995, Heraty et al. 2013). V kombinované morfologicko-molekulární analýze (na základě dvou genů a přes 200 morfologických znaků) vyšla podčeleď Megastigminae jako sesterská podčeleď Toryminae (Heraty et al. 2013).

Monofylie s Torymidae čistě na základě molekulárních znaků však nikdy podpořena nebyla (Janšta et al. 2018, Munro et al. 2011) a podčeleď Megastigminae se ukázala být ve skutečnosti samostatnou čeledí Megastigmidae.

Samotná monofylie Megastigmidae (resp. Megastigminae) nikdy zpochybněna nebyla (Bouček 1988a, Grissell 1995, Heraty et al. 2013, Munro et al. 2011), ale až teprve studie Janšta et al. (2018) se pokusila objasnit i její vnitřní fylogenezi (viz obr. 1).

Studie Munro et al. (2011) klade Megastigmidae do příbuzenstva například rodů *Asaphes* (Pteromalidae: Asaphinae), *Espinosa* a *Aditrochus* (Pteromalidae: Ormocerinae) a *Oodera* (Pteromalidae: Cleonyminae). Je však nutno brát v potaz, že čeleď Pteromalidae je polyfyletická (Heraty et al. 2013, Munro et al. 2011).



Obr. 1: Fylogeneze čeledi Megastigmidae sestavená na základě sekvenace pěti genů (upraveno dle Janšta et al. 2018).

### iii. Přehled rodů čeledi Megastigmidae, jejich rozšíření a biologie

Následuje stručný přehled rozšíření, biologie a počtu druhů jednotlivých rodů, další podrobnosti o jednotlivých taxonech jsou součástí Přílohy 1.

Čeleď Megastigmidae obsahuje přibližně 200 platných druhů ve 12 rodech (Noyes 2020). Ač jsou její zástupci rozšířeni celosvětově, velká většina rodů a druhů čeledi Megastigmidae (10 rodů z 12) se vyskytuje v australské oblasti (Bouček 1988a, Grissell 1999) a to včetně mnoha nepopsaných druhů (Bouček 1988a; Janšta & Böhmová, vlastní pozorování). Mezi endemické australské rody patří *Bortesia*, *Ianistigmus*, *Malostigmus*, *Neomegastigmus* a *Paramegastigmus*. Pouze rody *Macrodasyceras* a *Mangostigmus* se v Austrálii vůbec nenalézají. Rody *Bootanellus*, *Bootanomyia*, *Bootania* a údajně také *Westralianus* jsou rozšířeny jak v Austrálii, tak v jiných částech světa (zejména orientální a palearktické oblasti)

(Bouček 1988a, Doğanlar 2011a a 2011b, Grissell & Desjardins 2002, Kamijo 1962, Yao et al. 2017). V případě rodu *Westralianus* jsou však na místě pochybnosti (viz níže).

Pouze rod *Megastigmus* se oproti většině ostatních rodů vymyká především tím, že má nejhojnější zastoupení v holarktické oblasti, rozšířen je však celosvětově (Auger-Rozenberg et al. 2006, Bouček 1988a, Noyes 2020, Roques et al. 2016). Nicméně v neotropické oblasti nalezneme naprosté minimum druhů, navíc zpravidla jen zavlečených spolu se svými hostitelskými rostlinami (Doğanlar 2015, Doğanlar et al. 2013, Scheffer & Grissell 2003) nebo přesahující z nearktické oblasti (Grissell 1999). Snad jedinou výjimkou v tomto ohledu je relativně nově popsáný druh *M. colombianus* popsáný z Kolumbie a vyvíjející se v semenech *Ilex kunthiana* (Aquifoliaceae – cesmínovité) (Caicedo et al. 2015).

Se svými 145 popsanými platnými druhy představuje rod *Megastigmus* (obr. 2 a 3) zdaleka nejpočetnější a nejvíce studovaný rod čeledi (Noyes 2020). V rámci tohoto rodu se nachází jak druhy parazitoidní (koinobiontní endoparazitoidi, z nichž někteří se nejspíš přiživují i na tkáni hálky hostitele), tak především predátoři semen krytosemenných rostlin i semen jehličnanů (Bouček 1988a, Grissell 1999, Roques et al. 2016, Roques & Skrzypczyńska 2003).

Co se týče parazitických zástupců, udává se parazitoidismus na různých skupinách hálkotvorného dvoukřídlého hmyzu (Diptera), blanokřídlého hmyzu (např. Hymenoptera: Cynipidae, Eulophidae, Eurytomidae, Pteromalidae) či červcích (Hemiptera: Coccoidea) (Bouček 1988a, Doğanlar & Hassan 2010, Goolsby et al. 2001, Grissell 1999). Endemické parazitoidní druhy se uvádí jen z australské oblasti (Bouček 1988a, Noyes 2020) nebo přilehlé orientální oblasti (Doğanlar 2015, Grissell 1999, Narendran et al. 2003 a 2010). Dále do světa, konkrétně do palearktické, neotropické a afrotropické oblasti, více expandovaly pouze druhy, které se pravděpodobně rozšířily spolu s jejich hostitelskou rostlinou blahovičníkem (*Eucalyptus*, Myrtaceae – myrtovité). Většina z nich parazituje hálkotvorný druh *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) (Doğanlar 2015, Doğanlar & Hassan 2010, Doğanlar et al. 2013, Grissell 2006, Hernández et al. 2015). Nedávno bylo zjištěno, že mnohé z těchto druhů jsou ve skutečnosti tytéž a byly synonymizovány (Le et al. 2020).

Býložravé druhy se naopak téměř vždy vyskytují mimo Austrálii. Mezi původními australskými druhy dokonce nebyl spolehlivě potvrzen žádný fytofág (Bouček 1988a, Grissell 1999, Roques et al. 2016, Roques & Skrzypczyńska 2003). Jejich nejdiverzifikovanější linii, skýtající téměř 50 platných druhů (Noyes 2020) a vyskytující se dominantně v holarktické oblasti, představují zástupci požírající semena nahosemenných rostlin. Tyto leckdy vysoce hostitelsky specializované druhy údajně tvoří monofyletickou linii (Auger-Rozenberg et al.

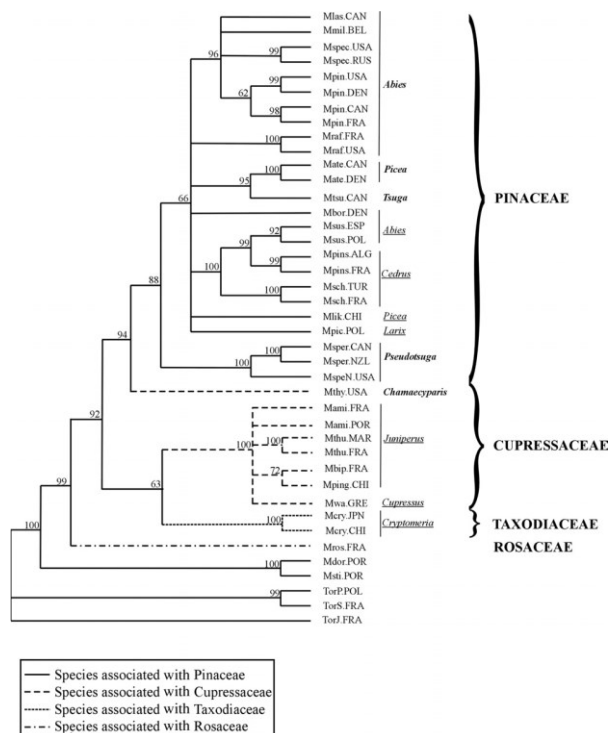


2006). Ta se dle této studie (na základě sekvenace dvou genů – mitochondriální cytochrom b a D2 segment 28s rDNA) dělí na čtyři linie (viz obr. 4).



Obr. 2 a 3: 2, *Megastigmus* sp. JBOH00056\_0101\* (vlevo, samice; foto: Petr Janšta); 3, *Megastigmus aculeatus* (vpravo, samice; foto: <https://insektarium.net/hymenoptera-2/torymidae-raniszkowate/megastigmus-aculeatus-znamionek-rozany/>).

Nejodvozenější linie je asociovaná s čeledí Pinaceae – borovicovité, kde jako sesterské ostatním jsou uváděny druhy živící se na rodu *Pseudotsuga* – douglaska. Této větvi je sesterská linie obsahující rod *Chamaecyparis* (cypřišek). Zástupce na něj vázaný (*Megastigmus thyoides*) je zároveň jediným nearktickým druhem asociovaným s čeledí Cupressaceae (cypřišovité). Třetí linie napadá semena čeledi Cupressaceae a její sesterská čtvrtá linie se živí semeny čeledi Taxodiaceae.



Obr. 4: Fylogeneze zástupců rodu *Megastigmus* vyvíjející se na jehličnanech na základě sekvenace cytochromu b a D2 28S rDNA (upraveno dle Auger-Rozenberg et al. 2006).

\*Pozn.: Všechny fotografie zástupců čeledi Megastigmidae, u kterých je uveden kód, jsou jedinci použité ve výsledné fylogenezi této práce a byli foceni po izolaci DNA.

Podle závěrů této studie jsou druhy linie vyvíjející se na Pinaceae oproti linii vyvíjející se na Cupressaceae výrazně méně hostitelsky specializované, a tudíž mají větší invazivní potenciál a v oblasti introdukce se snáze adaptují na původní druhy jehličnanů (např. přesun amerických druhů na palearktické druhy rodu *Abies* – jedle) (Auger-Rozenberg et al. 2006).

Právě tyto i mnoho dalších druhů rodu *Megastigmus* napadajících semena jehličnanů (ale i několik druhů napadajících krytosemenné rostliny) jsou považovány za závažné škůdce s invazivním potenciálem. V nepůvodním areálu jsou schopny napadat zpravidla stromy stejného rodu jako v jejich areálu původním a způsobovat tak velké škody na produkci semen. Stejně tak původní druhy většinou pronikají na introdukované druhy jehličnanů stejného rodu jako je jejich původní hostitelská rostlina. Přeskoky na jiné rody jsou vzácné (Auger-Rozenberg & Roques 2012, Roques & Skrzypczyńska 2003).

Zdaleka „nejpostiženějším“ kontinentem je v tomto ohledu Evropa, kde bylo zaznamenáno nejvíce invazních druhů (celkem 11), z nichž většina pochází ze Severní Ameriky, ale pár druhů také z Blízkého východu či severní Afriky (Roques & Skrzypczyńska 2003).

Ekonomické dopady jsou znatelné zejména u invazního druhu *M. spermotrophus* napadajícího introdukované douglasky (*Pseudotsuga*) (Jarry et al. 1997), ale také u v Evropě původního *M. schimitscheki* postihujícího cedry zavlečené z jihovýchodní do jihozápadní Evropy, kde začal napadat i druh *Abies pinsapo* (Fabre et al. 2004). *M. spermotrophus* zde ukazuje fenomén, kdy introdukovanou dřevinu napadají její původní škůdci, v nově osídlené oblasti však tyto škůdci nemají konkurenty v podobě ostatních druhů z jejich domoviny, a tak na stromech působí mnohem větší škody než v původním areálu. To se týká zejména stromů, které nemají v novém areálu žádné příbuzné druhy stejného rodu, jejichž škůdci by je napadali (Roques et al. 2006).

Hlavní příčinou invazivní disperze rodu *Megastigmus* po celém světě je šíření spolu s globálním trhem se semeny. Identifikovatelnost napadených semen a detekce uvnitř vyvíjejících se larev je však náročná (Auger-Rozenberg & Roques 2012, Fabre et al. 2004, Turgeon et al. 1994). Jedním z hlavních důvodů je to, že samice pomocí dlouhého kladélka klade vajíčka rovnou do semen, kde proběhne celý larvální vývoj. Vzhledem k takto kryptickému způsobu života larvy není snadné odhalit její přítomnost. Plody totiž nenesou žádné nebo téměř žádné znaky napadení. Detekovat larvy lze tedy spolehlivě jen pomocí rentgenu (Auger-Rozenberg & Roques 2012). V poslední době se však objevil ještě jeden způsob přibližného určení přítomnosti larev v semenech – separace semen na základě jejich rozdílné váhy v gravitačním separátoru (Matallana-Ramirez et al. 2020).

Je patrné, že zástupci tohoto rodu si vyvinuli mnoho dalších adaptací usnadňujících jejich disperzi. Další příčinou jejich úspěchu je například fakt, že semena rostlin jsou prodávána už zralá, a tedy obsahují larvy v posledním a nejodolnějším instaru (Auger-Rozenberg & Roques 2012).

S tím souvisí i schopnost tohoto posledního stádia vstoupit do tzv. prodloužené diapauzy (prolonged diapause), ve které může setrvat až několik let a překlenout tak neúrodné roky a výkyvy v produkci semen (Roux et al. 1997, Turgeon et al. 1994). Začátek i konec diapauzy larva řídí mimo jiné podle okolní teploty a částečně i podle fotoperiody, vliv však jistě bude mít mnohem větší množství faktorů (Matallana-Ramirez et al. 2020, Roux et al. 1997).

Vysoce specializovanou schopností ovlivňující šance těchto druhů je i manipulace s napadeným zárodečným vakem semene. U již zmiňovaného druhu *Megastigmus spermotrophus* bylo pozorováno, že je schopen navodit v neoplozeném zárodečném vaku procesy nahromadění živin, které by jinak nastaly pouze po oplodnění, a tím zabráni degeneraci vaku. Tato schopnost tedy zbavuje parazita závislosti na opylení jeho hostitele a zvyšuje jeho odolnost vůči výkyvům v úrodě. Jedná se svým způsobem o děj značně podobný tvorbě hálek (von Aderkas et al. 2005). Je vysoce pravděpodobné, že podobný mechanismus se bude uplatňovat u více druhů. Uvažuje se, že i ostatní druhy vázané na Pinaceae disponují těmito schopnostmi, jelikož jejich typická doba kladení předchází oplození zárodečného vaku (Matallana-Ramirez et al. 2020, Rouault et al. 2004). Na rozdíl od nich druhy napadající Cupressaceae napadají nejspíš pouze semena s již oplodněným zárodečným vakem a vyvinutým samičím gametofytem (Rouault et al. 2004).

Mimo jiné může v jejich šíření hrát roli i způsob rozmnožování. Většina druhů rodu *Megastigmus* se množí pomocí arrhenotokie (tedy způsobem převládajícím u blanokřídlého hmyzu – Cook 1993), kdy se oplozená vajíčka vyvíjejí v diploidní samice a neoplozená v haploidní samce. Jiné druhy (např. *M. alba*, *M. aculeatus*, *M. rosae*, *M. pictus*, *M. pinsapinis* či *M. suspectus*) se vyznačují thelytokní partenogenezí, kde se neoplozená vajíčka vyvinou v diploidní samice, což osvobozuje samice od nutnosti hledání partnera (Auger-Rozenberg et al. 2006, Auger-Rozenberg & Roques 2012, Boivin & Candau 2007, Roques & Skrzypczyńska 2003). Nicméně navzdory tomu jsou významné invazivní druhy v Evropě (*M. rafni*, *M. milleri*, *M. pinus*, *M. nigrovariegatus*, *M. spermotrophus* či *M. schimitscheki*) arrhenotokní a mnozí z nich vytlačují thelytokní druhy či jim alespoň úspěšně konkurují (Auger-Rozenberg & Roques 2012).

V neposlední řadě může být za vysokým invazivním úspěchem některých zástupců i fakt, že některé druhy byly introdukovány opakovaně z vícero míst, a jejich hybridní potomci mohou

tedy mít díky novým genotypovým kombinacím vyšší invazní potenciál (Auger-Rozenberg & Roques 2012).

Způsobem života fytofágních zástupců rodu *Megastigmus* nenapadajících jehličnany se zabývá podstatně menší počet studií. Semenožravé druhy vázané na krytosemenné rostliny skýtají okolo 30ti platných druhů a vyvíjejí se např. na čeledích Anacardiaceae (ledvinovníkovité), Aquifoliaceae (cesmínovité), Fabaceae (bobovité), Hamamelidaceae (vilínovité), Malvaceae (slézovité), Rhamnaceae (řešetlákovité) či velmi hojně na Rosaceae (růžovité) (Noyes 2020, Roques et al. 2016, Roques & Skrzypczyńska 2003). Jejich diverzita však bude nejspíše mnohem vyšší, než se v současnosti uvádí, a mnoho druhů (zejména mimo holarktickou oblast) stále není popsáných, což dokládá mimo jiné nedávný popis několika nových druhů z afrotropické (Roques et al. 2016) a neotropické oblasti (Caicedo et al. 2015).

I mezi predátory semen krytosemenných nalezneme škůdce. Do USA zavlečený *M. aculeatus* byl dříve považován za škůdce *Rosa multiflora*, nicméně teď je tato rostlina sama považována za invazní a druh *M. aculeatus* tudíž za užitečný (Grissell 1999). Další druhy napadají např. pistácie (*Pistacia*) – *M. pistaciae*, některé odrůdy jablek (např. *Malus baccata*) – *M. mali*, či pepřovce (*Schinus*) – *M. transvaalensis* a *M. pistaciae* (Grissell 1999).

Nevyřešenou otázkou však zůstává, jaká byla původní potravní strategie larev v tomto rodu. Není známo, zda byl u společného předka rodu přítomen parazitoidismus nebo naopak fytofágie, zda se *Megastigmus* původně vyskytoval na nahosemenných či krytosemenných rostlinách a zda k přechodu mezi těmito dvěma skupinami došlo jednou či několikrát, a tedy zda linie spjaté s krytosemennými rostlinami tvoří monofyletickou skupinu.

Pouze velmi málo prací se také věnuje ostatním rodům této čeledi. Biologie mnoha zástupců není známa a někdy není známa ani u celých rodů. To se týká rodů *Ianistigmus* a *Malostigmus* (obr. 5 a 6), kde byl v každém rodě popsán pouze jediný druh (Bouček 1988a, Grissell 1999, Noyes 2020).



Obr. 5 a 6: 5, *Ianistigmus tatianae* JBOH00040\_0101 (vlevo, samice); 6, *Malostigmus* JBOH00089\_0101 sp. (vpravo, samice) (Foto: Petr Janšta).

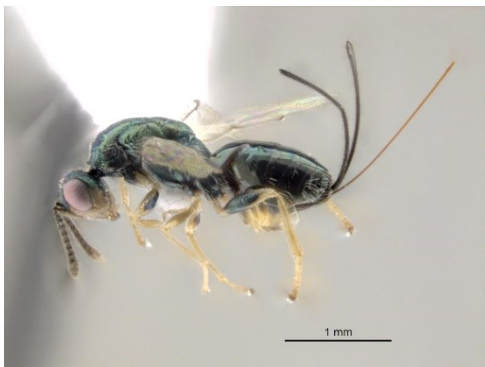
I u parazitických rodů *Mangostigmus*, *Neomegastigmus*, *Paramegastigmus* a *Westralianus* (obr. 7 až 10) je známo druhů pouze několik (Noyes 2020). První dva rody napadají bejlomorky (Bouček 1988a, Narendran et al. 2004, Narendran & Vijayalakshmi 2007) a rod *Paramegastigmus* byl vychován z neznámých hálek (Bouček 1988a). U západopalearktického zástupce rodu *Westralianus* se uvádí parazitace blíže neurčených larev motýlů žijících v hálkách (Doğanlar 2011a). Je ovšem otázkou, zda v identifikaci posledního zmíněného exempláře nedošlo k omylu, jelikož takováto druhová distribuce (jeden druh popsáný v Austrálii a jeden v Turecku) se jeví poněkud nepravděpodobnou.



Obr. 7 až 10: 7, *Mangostigmus* sp. (vlevo nahoře, samice); 8, *Neomegastigmus* sp. JBOH00072\_0101 (vpravo nahoře, samice); 9, *Paramegastigmus* sp. (vlevo dole, samec); 10, *Westralianus* sp. JBOH00101\_0101 (vpravo dole, samec) (Foto: Petr Janšta).

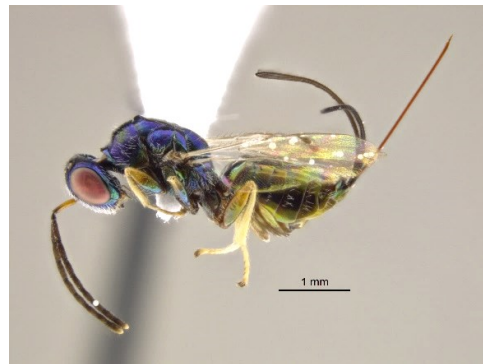
Nejpočetnějším parazitickým rodem čeledi je se svými 22 popsánymi druhy rod *Bootanomyia* (obr. 11 a 12). U druhů, jejichž biologie je známa (což jsou pouze palearktické druhy), jsou larvy parazitoidy larev žlabatek (Hymenoptera: Cynipidae) (Bouček 1988a, Doğanlar 2011b, Grissell 1999, Noyes 2020). Dle Janšta et al. (2018) se jedná o parařyletický rod, kde je jedna linie palearktická a jedna australská (viz obr. 1).





Obr. 11 a 12: 11, *Bootanomyia* sp. JBOH00028\_0101 (vlevo, samice); 12, *Bootanomyia dumicola* JBOH00068\_0101 (vpravo, samice) (Foto: Petr Janšta).

Neznámou biologii má i většina druhů rodu *Bootanelleus* (obr. 13 a 14). Některé druhy jsou asociovány s rodem *Casuarina* (Casuarinaceae – přesličníkovité) a minimálně druh *B. orientalis* je prokázaným predátorem semen (Bouček 1988a). Spolu s hostitelskou rostlinou *C. equisetifolia* se rozšířil mimo domovskou oblast do USA a Karibiku, kde je slibným kandidátem na biologickou kontrolu této invazní rostliny (Wheeler et al. 2011). Jiný druh, *B. nonvitta*, byl vychován z hálek vytvořených druhem *Bruchophagus fells* (Hymenoptera: Eurytomidae) na rodu *Citrus*, kde je nejspíš parazitoidem jejich tvůrce (Mo & Stevens 2014).



Obr. 13 a 14: 13, *Bootanelleus* sp. JBOH00069\_0101 (vlevo, samice); 14, *Bootanelleus hyalinus* sp. gr. JBOH00018\_0101 (vpravo, samice) (Foto: Petr Janšta).

Mezi méně druhově početné býložravé rody patří dále východopalearktický rod *Macrodasyceras*, jehož dva popsání druhy se vyvíjejí v semenech čeledi Aquifoliaceae (Grissell & Desjardins 2002, Kamijo 1962). Dříve byl synonymizován s rodem *Bootania* (Bouček 1988a), tvořeným na poměry čeledi gigantickými, až 4,5 cm (včetně kladélka) dlouhými zástupci napadajícími semena čeledi Pandanaceae (pandánovité), jejichž areál zasahuje až do Oceánie (Grissell & Desjardins 2002, Yao et al. 2017). Nicméně později byl *Macrodasyceras* znovu povýšen na samostatný rod (Grissell & Desjardins 2002) (obr. 15).

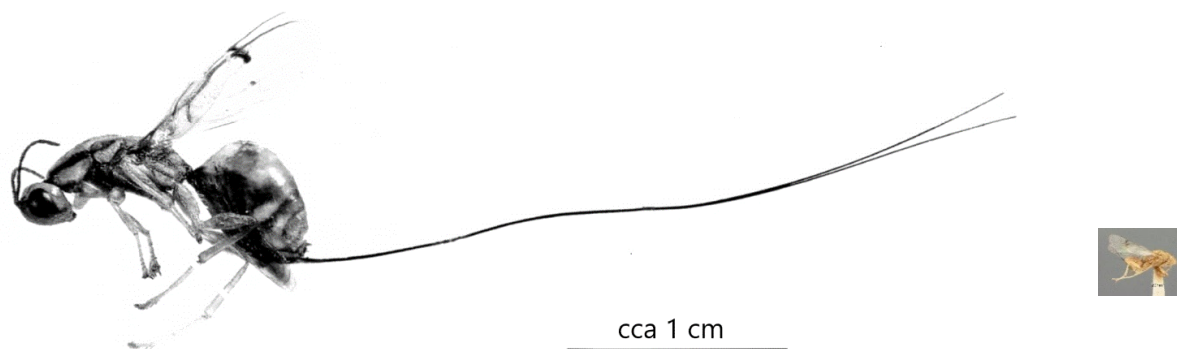


Fig. A. *Bootania maxima*, female, habitus.

Obr. 15: Vzájemné porovnání rodů *Bootania* (vlevo, samice, skutečná velikost těla bez kladélka cca 1,5 cm; upraveno dle Grissell & Desjardins 2002) a *Macrodasyceras* (vpravo, samice, skutečná velikost těla bez kladélka cca 0,3 cm, foto: Petr Janšta). Měřítka jsou shodná pro oba dva zástupce.

Posledním rodem je pozoruhodný fytofágní rod *Bortesia* (obr. 16). Je vázaný na rostlinu *Hakea* (obr. 17) z čeledi Proteaceae (proteovité) a jedná se o jediný hálkotvorný rod čeledi (Riek 1966).



Obr. 16 a 17: 16, *Bortesia* sp. JBOH00036\_0101 (vlevo, samec); 17, zduřelý pupen (háčka) na rostlině *Hakea* s otvorem po vylíhnutí (vpravo) (Foto: Petr Janšta).

Hálkotvornost byla sice v minulosti popsána i pro druh *Megastigmus zebrinus* napadající eukalypty v australské, afrotropické i neotropické oblasti (Grissell 2006, Hernández et al. 2015), ale následně byla opět zpochybněna (Klein et al. 2015). Zajímavostí je, že i další zdroje hovoří u rodu *Megastigmus* o schopnosti indukovat háčky (na eukalyptech – Myrtaceae a akáciích – Fabaceae), ovšem žádné konkrétní informace nejsou zmíněny (Bouček 1988a, Riek 1966).

Výše uvedené případy jasně demonstrují nedostatek detailních informací ohledně biologie jednotlivých zástupců a obtížnost jejich zkoumání. Až u poloviny popsáných druhů není vůbec znám hostitel. Problém se týká zejména právě biologie mnoha z hálek vychovaných zástupců, poněvadž v nich mohou zaujímat strategii parazitoida, inkvilína, či být jejich tvůrci (Grissell 1999, Noyes 2020).

### c) Ultraconserved elements (UCEs)

Jedná se o jednu z nejnovějších, nejpresnějších a časově i finančně nejefektivnějších metod sekvenace DNA (Blaimer et al. 2016, Branstetter et al. 2017a, Faircloth et al. 2012, Zhang et al. 2019). Jako „ultraconserved elements“ (dále UCEs) jsou označovány extrémně konzervované úseky jaderné DNA, které mají vysokou podobnost napříč mnoha relativně vzdálenými taxony. Obecně se jedná o krátké úseky DNA (u Amniota zpravidla okolo 92 párů bází, rozsah 60-742, odděleny od sebe obvykle  $188.150 \pm 12.485$  páry bází) (Bejerano et al. 2004, Faircloth et al. 2012). Nalézáme je rozprostřené po mnoha místech genomu a při meióze se pravděpodobně nezávisle rozcházejí (Faircloth et al. 2012, Glazov et al. 2005). U hmyzu jsou však UCEs v porovnání s obratlovci kratší a méně početné (Glazov et al. 2005, Makunin et al. 2013). UCEs se zpravidla nacházejí v nekódujících částech genomu a v intronech (Bejerano et al. 2004, Glazov et al. 2005, Zheng & Zhang 2008), i když u hmyzu mohou kódující části v rámci „flanking regions“ (lokusů nacházejících se vedle UCEs, které jsou také sekvenovány) být delší než u obratlovců a převažovat nad nekódujícími UCEs (Branstetter et al. 2017a, Makunin et al. 2013). To potenciálně umožňuje kombinaci UCEs dat s transkriptomovými daty (jako např. v Bossert et al. 2019).

UCEs byly identifikovány u mnoha nepříbuzných taxonů Metazoa, jako např. Porifera, Cnidaria, Echinodermata (Ryu et al. 2012), Arthropoda (Branstetter et al. 2017a, Faircloth et al. 2015, Glazov et al. 2005, Ryu et al. 2012, Siepel et al. 2005), Nematoda (Siepel et al. 2005), u mnoha obratlovců napříč všemi velkými třídami (např. Bejerano et al. 2004, Faircloth et al. 2012 a 2013, Ryu et al. 2012, Siepel et al. 2005, Smith et al. 2014). Mimo Metazoa byly UCEs nalezeny např. u některých Saccharomycotina (Ascomycota) (Siepel et al. 2005). Neobvykle dlouhé UCEs se podařilo objevit také u rostlin (Zheng & Zhang 2008). V rámci Metazoa se UCEs vyvinuly zřejmě již u jejich společného předka a v jednotlivých liniích se dále vyvíjely (Ryu et al. 2012).

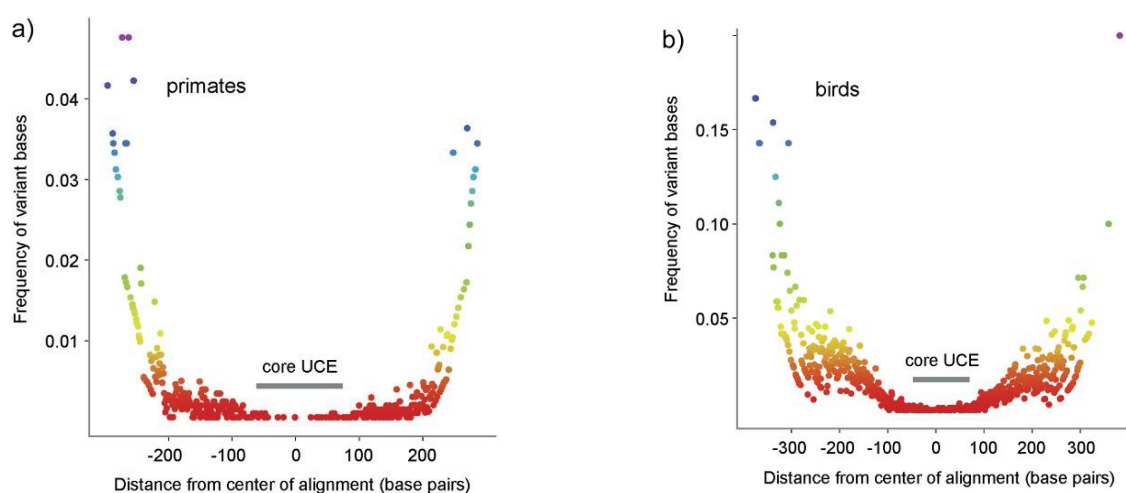
Zdá se, že početnost UCEs do určité míry pozitivně koreluje s velikostí genomu či komplexitou organismu a z toho vyplývající složitostí ontogenetického vývoje (Glazov et al. 2005, Zheng & Zhang 2008).

Důvody pro jejich vysokou konzervovanost v čase (pro obratlovce se uvádí až 20x pomalejší tempo evoluce, než je průměr v rámci genomu – Bejerano et al. 2004) nejsou plně známy. Uvažuje se zejména o silné negativní selekci bránící akumulaci jakýchkoli mutací a naznačující klíčovou roli UCEs jakožto regulačních oblastí (Bejerano et al. 2004, Glazov et al. 2005, Makunin et al. 2013, Ryu et al. 2012, Siepel et al. 2005). Ukázalo se, že UCEs ležící



mimo exony (v intronech či v nekódujících mezigenových oblastech) se agregují v „clusterech“ poblíž regulátorů embryonálního vývoje a vývoje nervové soustavy (včetně Homeobox a PAX6), transkripčních faktorů, genů pro RNA vázající proteiny a genů pro transportní proteiny a iontové kanály (Bejerano et al. 2004, Glazov et al. 2005, Ryu et al. 2012). Transkribované UCEs jsou po genomu rozptřeny více náhodně a budou pravděpodobně zapojeny v regulaci splicingu (Bejerano et al. 2004). Podobná funkce se předpokládá i u jim podobných HCEs (highly conserved elements), které jsou o něco delší a méně konzervované (Siepel et al. 2005).

Na druhou stranu existují i práce nepodporující jejich výše popsanou nepostradatelnost. Ahituv et al. (2007) experimentálně odstranili vybrané UCEs z genomu myši, které ovšem navzdory tomu byly překvapivě plně životaschopné a fertilní.



Obr. 18: Variabilita v oblastech přímo přiléhajících ke „core UCE“ oblasti zvyšující se spolu se vzdáleností od ní u a) primátů, b) ptáků. Na podélné ose je vyznačena vzdálenost od centra alignmentu v párech bazí. Na svislé ose je vyznačena frekvence výskytu záměn v párech bazí. Upraveno dle Faircloth et al. (2012).

Jedním z klíčů k úspěchu této metody je takzvaný „core UCE region“. Ten se vyznačuje mimořádně vysokou konzervovaností, a tak umožňuje snadný alignment. Naopak lokusy na něj přiléhající („flanking regions“) se v evoluci mění tím rychleji, čím jsou od něj vzdálenější (viz obr. 18) (Bejerano et al. 2004, Faircloth et al. 2012). Tyto úseky lze tedy použít jak k odhalování příbuznosti na úrovni rodů, tak k řešení hlubokých, desítky až stovky milionů let starých uzlů (Faircloth et al. 2012, 2013 a 2015, Smith et al. 2014) a jsou vhodné pro sestavování co nejpresnějších fylogenezí cílových skupin modelových (Glazov et al. 2005, Siepel et al. 2005) i nemodelových druhů organismů (např. Bossert et al. 2019, Branstetter et al. 2017a a 2017b, Cruaud et al. 2020, Faircloth et al. 2012, 2013 a 2015, Smith et al. 2014).

Nejvariabilnější úseky bude možné použít i pro výzkum vnitrodruhové variability (Smith et al. 2014).

Metoda sekvenace UCEs spadá do kategorie tzv. „target enrichment“, který poskytuje v porovnání s jinými metodami mnoho výhod (Blaimer et al. 2016, Faircloth et al. 2012, Mamanova et al. 2010). Při „target enrichment“ jsou vybrané genomické úseky (zde tedy UCEs) před sekvenací na MPS (massive parallel sequencing) platformě selektivně zachyceny z fragmentů DNA v knihovnách (na kterou byly navázány adaptéry) pomocí hybridizace se specifickými DNA či RNA sondami (probes, baits) a následně amplifikovány. Necílová DNA je z knihovny odplavena (Mamanova et al. 2010, Zhang et al. 2019).

Doposud byl v rámci zoologie nejpoužívanější „target enrichment“ metodou tzv. AHE (anchored hybrid enrichment) (Lemmon et al. 2012, Zhang et al. 2019). Hlavní rozdílem mezi UCE a AHE metodou je povaha sekvenovaných lokusů. AHE cílí na menší množství (okolo 500) méně konzervovaných lokusů, které jsou především kódující, a umí se vypořádat s variabilitou lokusů díky diverzifikovanějšímu setu sond (Lemmon et al. 2012), zatímco UCE se zaměřuje na více lokusů (>1000), které jsou kódující i nekódující a alespoň zčásti hodně konzervované (Branstetter et al. 2017a, Faircloth et al. 2015).

Dalším rozdílem (a obrovskou předností UCE oproti AHE) je volná dostupnost informací ohledně konkrétní UCE metodiky (sondy, laboratorní protokoly, analýza dat) a dříve publikovaných dat zajišťující zopakovatelnost experimentů a snažší proniknutí do metody pro nové uživatele (viz [www.ultraconserved.org](http://www.ultraconserved.org)) (Branstetter et al. 2017a, Zhang et al. 2019).

Oproti klasickému Sangerově sekvenování vyprodukuje metoda „target enrichment“ UCEs za relativně malých časových a finančních nákladů enormní množství dat (stovky až tisíce ortologních lokusů) (Blaimer et al. 2016, Branstetter et al. 2017a, Faircloth et al. 2012 a 2015, Mamanova et al. 2010, Zhang et al. 2019).

Výhody poskytuje i ve srovnání s celogenomovým sekvenováním. Nevyžaduje ani vytvoření tak velkého souboru knihoven (při „target enrichment“ UCEs vzniká pouze jedna knihovna na vzorek), ani zpracování enormního množství dat, a to při zachování vysoké informační hodnoty. Též stačí pouze jeden běh Illumina sekvenátoru. Celogenomová data jsou navíc po alignmentu užitečná jen v pár úsecích (Faircloth et al. 2012 a 2015, Mamanova et al. 2010) a celkové finanční výdaje za tento typ sekvenování jsou mnohem vyšší (Blaimer et al. 2016).

Veliké benefity má tato metoda i oproti sekvenaci transkriptomu. Ta totiž vyžaduje velice dobré uchování čerstvého materiálu v tekutém dusíku či v RNAlateru. UCEs lze však osekvenovat i z relativně starého (i přes sto let – Blaimer et al. 2016) lihového či suchého

muzejního materiálu, ze kterého lze získat pouze velmi malé množství DNA. To je přínosné pro sestavování fylogenezí skupin hmyzu, které mají velice malou tělesnou velikost (v řádu mm – Cruaud et al. 2020), a tedy z nich lze izolovat pouze velmi omezené množství DNA. Možnost zpracování malých, špatně konzervovaných a starých vzorků z muzeí nabízí obrovské možnosti získání sekvenačních dat ze značného množství i velice vzácných druhů (Blaimer et al. 2016, Faircloth et al. 2013 a 2015, Zhang et al. 2019).

Sekvenace UCEs se už dříve osvědčila pro sestavování fylogenezí v rámci blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera). Poprvé to bylo ve studii Faircloth et al. (2015), kde bylo identifikováno přes 1500 lokusů vhodných pro odhalování vzájemné příbuznosti a kde výsledná fylogeneze měla vysokou podporu a to včetně většiny hlubších uzlů. Vysokou podporu měla i v porovnání s jinými, jen o něco staršími fylogenetickými studiemi zabývajícími se vztahy v rámci Hymenoptera a sestavenými na několika málo vybraných genech (např. Heraty et al. 2011, Klopstein et al. 2013).

Od té doby vzniklo několik dalších prací úspěšně mapujících fylogenetické vztahy napříč různými skupinami Hymenoptera či vztahy v rámci těchto jednotlivých skupin právě za pomoci UCEs (např. Blaimer et al. 2016, Bossert et al. 2019, Branstetter et al. 2017a a 2017b, Cruaud et al. 2020).

Branstetter et al. (2017a) pak obohatili původní set sond hym-v1 (31.829 sond pro 2590 UCEs z původních 2749 sond pro 1510 UCEs) od Faircloth et al. (2015) a vyloučili špatně fungující lokusy. Hym-v1 byl založený pouze na dvou genomech (*Apis mellifera*, Apidae, a *Nasonia vitripennis*, Pteromalidae), díky čemuž nebyl optimální zejména pro skupiny „širopasých“, které jsou v rámci Hymenoptera od nich fylogeneticky nejvzdálenější (Faircloth et al. 2015). Avšak pro studie v rámci nadčeledi Chalcidoidea se osvědčil velmi dobře (Cruaud et al. 2019 a 2020).

Kromě Hymenoptera byly univerzální sondy designovány i pro další skupiny členovců (Arachnida, Coleoptera, Diptera, Hemiptera a Lepidoptera) (Faircloth 2017).

### 3) Cíle

- i) Vytvořit dobře podpořenou fylogenezi čeledi Megastigmidae metodou sekvenace tzv. „ultraconserved elements (UCEs)“ a to s využitím co nejširšího zastoupení jednotlivých taxonů a s ohledem na potravní strategii a biogeografii.
- ii) S pomocí vytvořené fylogeneze testovat obecné otázky týkající se celé čeledi, jako například: Co je původní potravní strategií čeledi a kolikrát vůbec došlo k přechodu od parazitoidního k fytofágnímu (semenožravému, hálkotvornému) způsobu života?
- iii) U rodu *Megastigmus* se pak podrobně zaměřit na to, zda:
  - (1) primární potravní strategií v rodě *Megastigmus* je parazitoidismus či semenožravost;
  - (2) je primární semenožravost na nahosemenných či krytosemenných rostlinách a kolikrát se tyto strategie vyvinuly.
- iv) Objasnit geografický původ čeledi.

#### 4) Materiál a metodika

##### a) Materiál

Pro studii byl použit nově nasbíraný i starší materiál uchovávaný v lihu, stejně tak i suché muzejní vzorky. Průměrné stáří vzorků bylo 14 let.

Jedinci byli nasmýkáni či dochováni ze semen hostitelských rostlin nebo hálek hostitelských druhů. Plody se semeny či háčky byly uskladněny v plastových krabičkách s přístupem vzduchu nebo v pevných uzavíratelných igelitových pytlících, do kterých byl přidán toaletní papír ke snížení vlhkosti (a tedy i snížení rizika zplsnivění). Vzorky byly ponechány v pokojové teplotě či za oknem. Kontrolovány byly každých 48 hodin. Vylíhnutí jedinci byli z krabiček či pytlíků odsáti pomocí exhaustoru a následně uchovávaní zpravidla v 1,5ml zkumavkách s 96% ethanolem a skladováni v mrazáku při -20 °C.

Muzejní materiál byl zapůjčen z těchto muzeí a sbírek: osobní sbírka J.-Y. Raspluse (Montpellier, Francie), Canadian National Collection of Insects and Arachnids (CNCI: Ottawa, Kanada), Queensland Museum (QM: Brisbane, Austrálie), Australian National Insect Collection (ANIC: Canberra, Austrálie), South Australian Museum (SAM: Adelaide, Austrálie), Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart (SMNS: Stuttgart, Německo).

Do fylogenetické analýzy byla zahrnuta i data od 21 zástupců již dříve sekvenovaných v laboratoři CBGP (Montferrier sur Lez, Francie, data pocházející od J.-Y. Raspluse a A. Cruaud) (viz Příloha 4). Jedná se konkrétně o:

ANIC00037_0189	<i>Chromeyrtoma</i> sp.
ANIC00053_0189	<i>Keirana</i> sp.
ANIC00092_0199	<i>Bootanelleus</i> sp.
BNIC00013_0201	<i>Chromeyrtoma</i> sp.
GDEL03057_0101	<i>Bootanomyia stigmatizans</i>
GENO00012_0101	<i>Ceratosolen solmsi</i>
JRAS01765_0189	<i>Nigeriella fuscipes</i>
JRAS06203_0199	<i>Megastigmus pistaciae</i>
JRAS06497_0101	<i>Leucospis brevicauda</i>
JRAS06686_0101	<i>Chalcedectus</i> sp.
JRAS07552_0389	<i>Megastigmus transvaalensis</i>
JRAS07425_0289	<i>Neomegastigmus</i> sp.
JRAS07425_0389	<i>Megastigmus</i> sp.
JRAS07594_0195	<i>Bootanomyia dorsalis</i>
JRAS08278_0101	<i>Bootania gigantea</i>
JRAS08291_0201	Nový rod / cf. <i>Megastigmus</i> sp.

PJAN01084_0101	<i>Malostigmus</i> sp. 2
PJAN01103_0101	<i>Bootanomyia</i> sp. 2
PJAN01062_0101	<i>Neomegastigmus</i> sp. 1
PJAN01211_0101	<i>Paramegastigmus</i> sp.
USNM00132_2090	<i>Megastigmus transvaalensis</i>

Jako „outgroups“ bylo vybráno celkem 12 vzorků na základě předběžné fylogenetické studie nadčeledi Chalcidoidea (Cruaud & Rasplus, nepublikovaná data), konkrétně:

*Chremeurytoma* sp. (Pteromalidae: Chremeurytominae) – 5 taxonů (2 sekvenované dříve – ANIC00037\_0189 a BNIC00013\_0201 – a 3 nově sekvenované – JBOH000001, JBOH000002 a JBOH000003);

*Keirana* sp. (Pteromalidae: Keiraninae) – 3 taxony (1 sekvenovaný dříve – ANIC00053\_0189 – a 2 nově sekvenované – JBOH000005 a JBOH000006);

*Chalcedectus* sp. (Pteromalidae: Cleonyminae) – 1 taxon (sekvenovaný dříve – JRAS06686\_0101);

*Ceratosolen solmsi* (Agaonidae: Kradibiinae) – 1 taxon (sekvenovaný dříve – GENO00012\_0101);

*Nigeriella fuscipes* (Agaonidae: Agaoninae) – 1 taxon (sekvenovaný dříve – JRAS01765\_0189);

*Leucospis brevicauda* (Leucospidae) – 1 taxon (sekvenovaný dříve – JRAS06497\_0101).

#### b) Molekulární metody

Sekvenace tzv. ultraconserved elements (UCEs) (Faircloth et al. 2015) byla provedena autorkou práce v laboratoři CBGP v Montferrier sur Lez (Francie) v listopadu a prosinci 2019. Izolace DNA i příprava knihoven probíhala podobně jako v Cruaud et al. (2019).

##### i. Izolace DNA

DNA ze všech vzorků byla izolována podle protokolu podrobně popsáno v příloze Cruaud et al. (2019), který je téměř nedestruktivní pro izolované vzorky a navíc vylepšuje původní protokol pro Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit. Protokol byl optimalizován pro vysoký zisk DNA z drobných zástupců Arthropoda a zároveň nízkou destruktivnost malých,

křehkých a starých vzácných muzejních vzorků. Zachování všech vzorků v dobrém stavu je nutné pro zpětné morfologické přeurčení.

DNA byla vyizolována z celkem 94 vzorků. Dvě prázdné zkumavky byly použity jako kontrola (jeden pro každou izolaci po 47 vzorcích).

## ii. Kvantifikace DNA

Koncentrace DNA byly měřeny přístrojem Qubit 3.0 Fluorometer. Pro přípravu knihoven bylo z 94 vzorků vybráno 75 vzorků (s přihlédnutím k biologii, biogeografii a koncentraci DNA), které byly přidány k 21 vzorkům DNA izolovaných již v ČR stejnou metodikou. Celkem tedy bylo vybráno 96 vzorků k přípravě knihoven a následné sekvenaci (Příloha 3).

## iii. DNA „shearing“ (fragmentace DNA) a rekoncentrace

Izolovaná DNA byla tzv. normalizována – připravena do 100 µl roztoku EB pufru a DNA (vzorek obsahoval průměrně cca 30 ng DNA; v ideálním případě 40 ng, ale to nebylo vždy možné). Ve vzorku bylo vždy minimálně 10 µl EB pufru. Roztok byl v 0,5ml Diagenode zkumavkách umístěn do „sonikační lázně“ o 4 °C a sonikován ultrazvukem v přístroji Bioruptor® Pico (Diagenode) vždy 15 sekund, což bylo následováno 90 sekund dlouhou pauzou. Celkem bylo těchto cyklů 8. DNA byla rozlámána na úseky o délce zhruba 400 párů bazí. Následně bylo 50 µl roztoku EB pufru a nalámané DNA odebráno a zamrazeno jako záloha (s výjimkou vzorků, kde bylo nutné celý objem použít pro rekoncentraci, viz níže).

Poté byla provedena rekoncentrace DNA u cenných vzorků, které při kvantifikaci nedosahovaly dostatečné koncentrace DNA (tj. > 0,111 ng/µl) – tedy neposkytovaly ani 10 ng DNA na 90 µl. V krajním případě byla rekoncentrace provedena dokonce i u dvou cenných vzorků rodu *Mangostimus*, které dokonce zprvu nevykazovaly žádnou měřitelnou DNA, jelikož i z takových vzorků se v laboratoři CBGP podařilo již dříve DNA úspěšně osekvenovat (Cruaud & Rasplus, osobní sdělení).

Postup byl následující: Rekoncentrace probíhala pomocí Agencourt AMPure XP Purification system (Beckman Coulter). K 100 µl roztoku nalámané DNA a EB pufru se přimíchalo 180 µl zvortexovaných Ampure beads o pokojové teplotě. Směs byla opět vortexována a 5 minut inkubována za pokojové teploty. Na dalších pět minut se vzorky umístily do magnetického stojanu a následně byl odstraněn supernatant. Vzorky byly ponechány na magnetickém stojanu a do každého bylo přidáno 200 µl 70% ethanolu. Po 30 sekundách byl opět odstraněn supernatant, opět přidáno 200 µl 70% ethanolu a potřetí

odstraněn supernatant. Vzorky byly s otevřeným víčkem ponechány 8 minut k vysušení za pokojové teploty. Při ponechání v magnetickém stojanu bylo přidáno 50 µl EB pufru, vzorky byly zvortexovány, ponechány 2 minuty k inkubaci a opět umístěny na 5 minut do magnetického pole. Poté bylo 50 µl supernatantu z každého vzorku přemístěno do 96-ti jamkové destičky k ostatním vzorkům.

#### iv. Oprava nezarovnaných konců fragmentů a adenylace 3'-konců

Tento krok zahrnoval zarovnání konců fragmentů (zkrácení přesahů na 3'-konci a doplnění při přesahu na 5'-konci) a adenylaci na jejich 3' koncích. Byl použit NEBNext Ultra II DNA Library prep kit for Illumina (NEB). Připraven byl mastermix obsahující 300 µl NEBNext Ultra II End Prep Enzyme a 700 µl NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer Mix. Do každé zkumavky s 50 µl nalámané DNA bylo přidáno 10 µl mastermixu a směs byla vortexována. Následně byly vzorky vloženy do termocycleru a inkubovány 30 minut při 20 °C a 30 minut při 65 °C.

#### v. Ligace adaptérů

Tento krok ihned navazoval na krok předešlý. Opět byl použit NEBNext Ultra II DNA Library prep kit for Illumina (NEB). Byla připravena směs 3000 µl NEBNext Ultra II Ligation master mix a 100 µl NEBNext Ligation enhancer. Do každého vzorku bylo přidáno 31 µl této směsi. Následovalo přidání adaptérů, 1,25 µl P1 adaptérů a 1,25 µl P2 adaptérů o koncentraci 1,5 µM tak, aby každý vzorek měl unikátní kombinaci P1 (1-16) a P2 (1-6) adaptérů (schéma označování vzorků viz tabulka 1.). Adaptéry obsahovaly amplifikační a sekvenační „primer sites“ a také úsek dlouhý 5-6 párů bazí určený pro identifikaci vzorků. Po zvortexování proběhla inkubace vzorků v termocycleru při 20 °C po dobu 15 minut.

Tabulka 1.: Schéma značení vzorků pomocí P1 a P2 adaptérů.

P1-1	P1-9	P1-1	P1-9	P1-1	P1-9	P1-1	P1-9	P1-1	P1-9	P1-1	P1-9
P1-2	P1-10	P1-2	P1-10	P1-2	P1-10	P1-2	P1-10	P1-2	P1-10	P1-2	P1-10
P1-3	P1-11	P1-3	P1-11	P1-3	P1-11	P1-3	P1-11	P1-3	P1-11	P1-3	P1-11
P1-4	P1-12	P1-4	P1-12	P1-4	P1-12	P1-4	P1-12	P1-4	P1-12	P1-4	P1-12
P1-5	P1-13	P1-5	P1-13	P1-5	P1-13	P1-5	P1-13	P1-5	P1-13	P1-5	P1-13
P1-6	P1-14	P1-6	P1-14	P1-6	P1-14	P1-6	P1-14	P1-6	P1-14	P1-6	P1-14
P1-7	P1-15	P1-7	P1-15	P1-7	P1-15	P1-7	P1-15	P1-7	P1-15	P1-7	P1-15
P1-8	P1-16	P1-8	P1-16	P1-8	P1-16	P1-8	P1-16	P1-8	P1-16	P1-8	P1-16
P2-1		P2-2		P2-3		P2-4		P2-5		P2-6	



#### vi. Purifikace, odstranění dimerů adaptérů

Purifikace probíhala pomocí Agencourt AMPure XP Purification system (Beckman Coulter) obdobně jako rekoncentrace (viz bod iii.) s následujícími obměnami: k 93,5 µl směsi se přimíchalo 75 µl zvortexovaných Ampure beads, bylo přidáno 16 µl EB pufru a nakonec bylo 15 µl směsi z každého vzorku přemístěno do nové 96-ti jamkové destičky.

#### vii. Amplifikace DNA pomocí PCR

Opět byl použit NEBNext Ultra II DNA Library prep kit for Illumina (NEB). Připraven byl mastermix obsahující 2500 µl NEBNext Ultra II Q5 Master Mix (ten byl předtím rozmražen a zhomogenizován pietováním), 200 µl RAD Lib F (10 µM) a 200 µl RAD Lib R (10 µM) a do každého vzorku bylo přidáno 29 µl této směsi. Po zvortexování byly vzorky umístěny do termocycleru, kde proběhla PCR (viz tabulka 2.).

Tabulka 2.: Nastavení termocycleru pro PCR.

		15 cyklů			
Čas	30 s	10 s	75 s	5 min	∞
Teplota	98 °C	98 °C	65 °C	65 °C	10 °C

#### viii. Kvantifikace, ekvimolární „pooling“ a rekoncentrace

Koncentrace 2 µl každého vzorku byla měřena přístrojem Qubit 3.0 (viz Příloha 3). „Pools“ po 16 vzorcích a o stejné koncentraci DNA byly připraveny do šesti 1,5ml lo-bind Eppendorf zkumavek. Z každé knihovny bylo do „poolu“ odebráno množství odpovídající cca 100 ng DNA, aby se po rekoncentraci dosáhlo odpovídajícího množství (100-500 ng DNA) pro potřeby MYbaits® protokolu. Dále proběhla rekoncentrace obdobně jako výše: do „pools“ byly přidány Ampure Beads v poměru 0,8 Ampure Beads : 1,0 objem vzorku a následující postup byl stejný jako v bodě iii. s výjimkou kroku, kdy bylo přidáno pouze 10 µl EB pufru. Na konci bylo 9 µl DNA směsi přesunuto do nové lo-bind zkumavky. Ve stripu byl každý „pool“ naředěn (2 µl vody : 2 µl DNA). Kvantifikován pomocí Qubit byl 1 µl každého naředěného „poolu“. Následně byl profil knihoven zkontrolován přístrojem Agilent Bioanalyzer s High Sensitivity DNA Analysis Kit též za pomoci zředěné DNA.

#### ix. Hybridizace, zachycení („capture“) UCEs, PCR zachycených knihoven

UCEs z každého „poolu“ byly zachyceny pomocí 2749 sond navrženými Faircloth et al. (2015) za použití MYbaits® kitu (MYcroarray, Inc.). Postupovalo se podle protokolu Mybaits user manual version 4 (dostupné na <https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2018/04/myBaits-Manual-v4.pdf>). V tomto kroku došlo k hybridizaci specifických sond obohacených o biotin s cílovými úseky denaturované DNA. Do směsi byly přidány Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads, které mají vysokou afinitu k biotinu, a tedy se vážou k hybridizované DNA. Ostatní DNA je poté odplavena.

Hybridizační reakce běžela při 65 °C po dobu 24 hodin. Pro amplifikaci byl použit KAPA HiFi HotStart ReadyMix. PCR proběhlo ve 14 cyklech. Teplota „annealingu“ byla 65 °C. Délka extenze byla 45 s na jeden cyklus. Následně byly vzorky umístěny na 5 minut do magnetického stojanu a smíchány oba PCR produkty obdržené pro daný „pool“ v LoBind 1,5ml zkumavce (tedy vzniklo 6 „pools“). Finální purifikace supernatantu proběhla obdobně jako ty předešlé (viz bod iii.), poměr Ampure Beads a knihoven byl 1:1 (tedy 100 µl), bylo přidáno 25 µl EB pufru.

#### x. Kvantifikace a finální „pooling“

Koncentrace byla zmeřena u 2 µl z každé knihovny přístrojem Qubit 3.0, následně byl profil knihoven zkontrolován přístrojem Agilent Bioanalyzer pomocí 1 µl neředěných knihoven.

Dále byly knihovny zředěny nejdříve 1:50 (2 µl DNA na 98 µl vody), ty pak byly naředěny 1:500, aby se dosáhlo zředění 1:25.000, a ty nakonec byly ředěny 1:10 pro finální zředění 1:250.000.

Ve finále bylo provedeno qPCR (kvantitativní PCR) s pomocí Library Quantification Kit (Illumina/Universal from KAPA, KK4824) na přístroji Light Cycler 480.

Byl připraven mix (318 µl Mastermix Kapa + 106 µl H<sub>2</sub>O up) a do každého políčka bylo napipetováno 8 µl tohoto mixu. 96-ti jamková destička byla připravena dle následujícího schématu (viz tabulka 3.). Pro každou knihovnu (Lib 1-6) vzniklo 6 bodů, vždy tři se stejnou koncentrací (každá po 2 µl), dále 12 kontrolních standardů po 2 µl (Std 1-6), dva se samotným mixem (Tmix) a dva s Th2o (mix + 2 µl vody). Platíčko bylo pokryto folií, zvortexováno, zcentrifugováno a překryto speciální folií pro qPCR.

Tabulka 3.: Schéma 96-ti jamkové mističky pro qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25.000 Lib 1	25.000 Lib 2	25.000 Lib 3	25.000 Lib 4	25.000 Lib 5	25.000 Lib 6						
B	25.000 Lib 1	25.000 Lib 2	25.000 Lib 3	25.000 Lib 4	25.000 Lib 5	25.000 Lib 6						
C	25.000 Lib 1	25.000 Lib 2	25.000 Lib 3	25.000 Lib 4	25.000 Lib 5	25.000 Lib 6						
D	250.000 Lib 1	250.000 Lib 2	250.000 Lib 3	250.000 Lib 4	250.000 Lib 5	250.000 Lib 6						
E	250.000 Lib 1	250.000 Lib 2	250.000 Lib 3	250.000 Lib 4	250.000 Lib 5	250.000 Lib 6						
F	250.000 Lib 1	250.000 Lib 2	250.000 Lib 3	250.000 Lib 4	250.000 Lib 5	250.000 Lib 6						
G		Tmix	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Th2o			
H		Tmix	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Th2o			

Kvantitativní PCR proběhla s následujícím programem (viz tabulka 4.):

Tabulka 4.: Nastavení přístroje Light Cycler 480 pro qPCR.

Denaturace	95 °C	5 min	4,4 °C/s	1x
Amplifikace	95 °C	30 s	4,4 °C/s	35x
	60 °C	45 s	2,2 °C/s	
Křivka tání	95 °C	15 s	4,4 °C/s	1x
	60 °C	1 min	2,2 °C/s	
	95 °C	(kontinuální mód)	0,11/5 akvizic/°C	
Chlazení	40 °C	30 s	4,4 °C/s	1x

Byl připraven finální 12 µl „pool“ o 4 nM koncentraci obsahující všechny zředěné knihovny. „Paired-end“ sekvenování (2\*300 párů bází) proběhlo na Illumina Miseq platformě v UMR AGAP (Montpellier, Francie).

### c) Analýza dat

Celý proces analýzy molekulárních dat až po vytvoření finálního datasetu byl převzat z postupu Cruaud et al. (2019 a 2020) s využitím nepublikovaných skriptů dr. A. Cruaud. Detailní postup je k nahlédnutí u autorky práce. Zpracování dat probíhalo na „clusteru“ SLURM/Genologin (Genotoul Bioinfo) a částečně v programu Geneious 11.1.5 (Kearse et al. 2012).

#### i. Čištění a kontrola kvality molekulárních dat

Kontrola kvality prvotních nezpracovaných sekvencí byla provedena programem FastQ 0.11.2 (Andrews 2010). Další filtrování dat a ořezání neboli „trimming“ části adaptérů se provedlo pomocí programu Trimmomatic 0.36 (Bolger et al. 2014). Zfúzování překrývajících se „reads“ proběhlo v programu FLASH 1.2.11 (Magoč & Salzberg 2011).

Následoval tzv. „demultiplexing“ (přiřazení jednotlivých sekvencí ke vzorkům na základě identifikační sekvence barcodu adaptérů) dle soukromých skriptů dr. A. Cruaud, kde nebyly připuštěny žádné nesrovnalosti v barcodové sekvenci; musela zde být 100% shoda s adaptéry na obou koncích, aby byl „read“ ponechán. Poté byly sekvence P1 a P2 adaptérů odstraněny.

Sestavení „contigs“ z očištěných „reads“ bylo provedeno programem CAP3 (Huang & Madan 1999). „Contigs“ byly alignovány s referenčními UCEs pomocí programu LASTZ 1.02.00 (Harris 2007). „Contigs“, které alignovaly s více než jedním referenčním UCE, nebo naopak různé „contigs“, které alignovaly s tím samým UCE (tedy potencionální paralogy), byly vyfiltrovány za použití programu Geneious 11.1.5 (Kearse et al. 2012) a pro další postup vyřazeny. Nově získané sekvence byly přidány k již existujícímu datasetu UCEs sekvencí. Pět nejhorších vzorků bylo vyloučeno z následné fylogenetické analýzy (viz níže a Příloha 3).

#### ii. Fylogenetická analýza

Byl proveden výběr vhodných vzorků a „outgroups“, pro které už existovala UCEs data, a ty byly přidány k nově získaným sekvencím (Podrobnosti viz Příloha 4). Pro analýzu byly ponechány UCEs, které se vykytovaly aspoň u 56 vzorků (tedy u 50 %). Na každý lokus byl vytvořen jeden fasta soubor. Alignment proběhl v programu MAFFT 7.245, linsi, výchozí nastavení (Katoh & Standley 2013). Odstranění nejednoznačně alignovaných sekvencí bylo provedeno programem Gblocks (Catresana 2000). Fasta soubory byly konvertovány do phylip formátu. Finální strom včetně bootstrapových podpor byl vypočten metodou Maximální Likelihood (věrohodnost) v programu RAxML (Stamatakis 2006), model GTRGAMMA,

celkový počet replikací byl 10. Strom byl anotován v programu Treegraph 2.15 (Stöver & Müller 2010) a následně graficky upraven v programech CorelDRAW 2019 a Powerpoint Office.

### iii. Mapování biologických a biogeografických dat

Mapování údajů o biologii a biogeografii jednotlivých exemplářů na již vytvořený fylogenetický strom proběhlo v programu Mesquite 3.61 (Maddison & Maddison 2019).

Za parazitoidy byly považovány druhy čeledi Megastigmidae vylihnuté z hálek či fíků, kde se tato strategie jeví jako nejpravděpodobnější (Rasplus, osobní sdělení), a dále druhy, u nichž je parazitoidní způsob života zdokumentován v literatuře. Za fytofágní byly považovány druhy vychované z plodů rostlin, dále druhy, u nichž je fytofágie zdokumentována v literatuře, a také údajně hálkotvorný rod *Bortesia*, jehož zástupci byli vychováni z různých částí rostliny *Hakea*, do nichž samice kladou vajíčka (Janšta & Böhmová, vlastní pozorování; Riek 1966). Byla provedena analýza metodou maximální parsimonie (MP) a maximální věrohodnosti (ML).

Jako místo původního výskytu daného druhu byla vybrána zpravidla oblast, kde byl vzorek sebrán. V případě některých druhů to však byla oblast, kde je pro daný druh uváděn v literatuře původní výskyt. Taktéž byla provedena analýza metodou maximální parsimonie (MP) a maximální věrohodnosti (ML).

Biologická a biogeografická data jsou detailně shrnuta v Příloze 1, 2 a 4.

## 5) Výsledky

Vzorky byly sekvenovány pomocí metody tzv. „ultraconserved elements“. Finální fylogenetický strom byl sestaven na základě dat ze 112 zástupců, z nichž 21 bylo už sekvenovaných dříve v laboratoři CBGP. Zbývajících 91 (z 96 nově sekvenovaných) bylo tvořeno vybranými 70ti vzorky izolovanými autorkou práce též v laboratoři CBGP a 21 vzorky izolovanými autorkou dříve stejnou metodikou na domácím pracovišti. Z 96 nově sekvenovaných vzorků bylo 25 nasmykáno autorkou práce, dalších 6 přímo vychováno z hálek či rostlin a 65 získáno přímo z muzejních sbírek autorkou a školitelem či od zahraničních kolegů (detaily viz Příloha 2).

Celkem 12 vzorků představují „outgroups“ a 100 zástupců patří do čeledi Megastigmidae. Ve finálním datasetu je zastoupeno 11 z 12 dosud platných rodů čeledi.

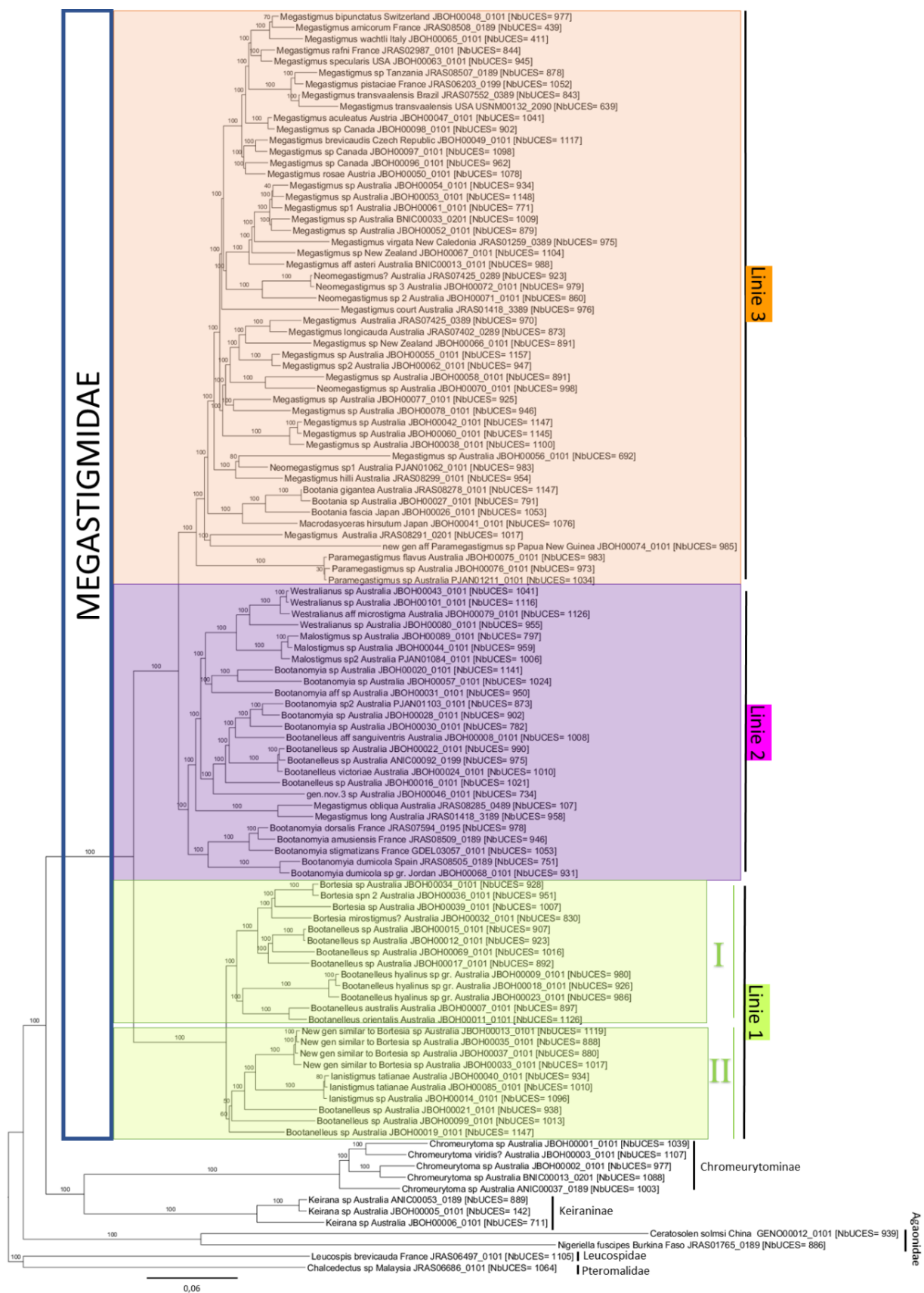
Jediný rod chybějící ve finálním datasetu je rod *Mangostigmus*. Sekvence těchto vzorků (celkem 2 vzorky) selhala nejspíš kvůli jejich stáří. Stejně tak selhaly tři další vzorky, a tedy celkem pět vzorků izolovaných v laboratoři CBGP (z původních 75ti) nebylo zařazeno do finální fylogenetické analýzy, ačkoli některé vykazovaly dostatečné množství vyizolovaného DNA, a to buď hned po izolaci (*Megastigmus pinsapinnis*), anebo po rekoncentraci a prvním PCR (oba zástupci rodu *Mangostigmus*, *Bootanomyia synophri*, *Bootanelleus nonvitta*). Jednalo se o staré vzorky (z let 1960 – *B. nonvitta*, 1968 – *B. synophri*, 1989 – *Mangostigmus*, neznámý rok u *M. pinsapinnis*). Nejstarší vzorek úspěšně zařazený do finálního datasetu pocházel z roku 1972. Nejmenší úspěšně použité množství DNA bylo 6 ng, které i tak vyústilo v získání 779 UCEs.

Dataset obsahuje 1210 lokusů (maximum pro jeden vzorek 1148 lokusů) o celkové délce zhruba 570.000 párů bazí. Obsah GC bází byl 46 %. Průměrně bylo z každého nového vzorku získáno 72 316 „reads“, 3064 „contigs“ a osekvenováno 997 UCEs. Průměrné množství vloženého DNA bylo 32 ng na vzorek (podrobnější informace jsou shrnuty v Příloze 3).

Taktéž nebyly zaznamenány žádné kontaminace. Až na několik málo výjimek byla většina uzlů ve fylogenetickém stromě podpořena bootstrapem 100 a to i včetně hlubokých uzlů.

### a) Fylogeneze čeledi Megastigmidae

Čeď Megastigmidae vyšla jako jasně monofyletická, přičemž podčeď Keiraninae a Chromeurytominae (obě Pteromalidae) tvoří společně monofylum a jsou sesterské čeledi Megastigmidae (viz obr. 19).



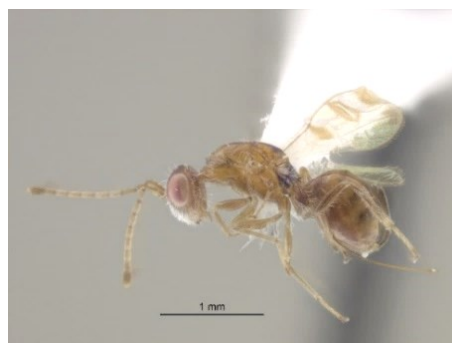
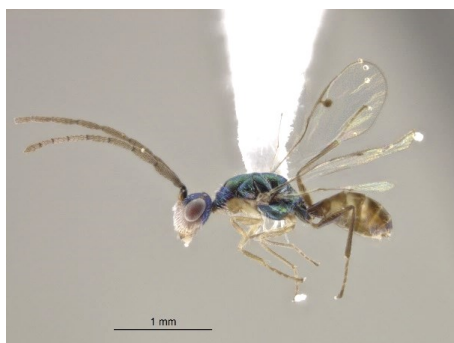
Obr. 19: Fylogenetický strom sestavený RAXML analýzou dat (celkově 1210 lokusů o délce 570.000 párů bází). Čísla v hranatých závorkách za názvy taxonů ukazují konkrétní osekenovaný počet lokusů pro daný taxon. Hodnoty bootstrapu jsou uvedeny uprostřed jednotlivých větví. Barevně jsou odlišeny jednotlivé linie.

Monofyletické jsou rody *Bootania*, *Bortesia*, *Ianistigmus*, *Malostigmus*, *Paramegastigmus*, *Westralianus* a nový nepopsaný rod. Čeleď se dělí na tři linie (viz obr. 19).

Do linie 1 se zařadily rody *Bootanelleus*, *Bortesia*, *Ianistigmus* a nový nepopsaný rod. Co se týče jejich morfologie, spojuje všechny jeden výběžek/zub na klypeu. Zároveň samci rodů této linie mají nápadně prodloužené články tykadel s alespoň třemi, často ale více řadami sensil (samci ostatních linií mají maximálně 2 řady sensil na tykadlový článek). Vzorek JBOH00014\_0101 zprvu určený jako *Bootanelleus* byl nakonec určen jako samec rodu *Ianistigmus* (viz obr. 20), od kterého samci nebyli dříve známi (Bouček 1988a).

Problémový je v této linii rod *Bootanelleus*, který v současném morfologickém pojetí (Bouček 1988a) nevyšel jako monofyletický, ale jeho zástupci, navzájem velmi podobní, se objevili jak v první (I) tak v druhé (II) větvi linie 1 (viz obr. 19). Pouze druhy *B. orientalis* a *B. australis*, které jsou dobře morfologicky odlišitelné od ostatních zástupců rodu, tvoří monofylum. Druhový komplex *B. hyalinus* sp. gr. je také dobře odlišitelný od ostatních zástupců rodu, a to ve skulptuře těla a u samic ve tvaru tykadel (podlouhlé články s 6 a více řadami sít). Mezi dvěma ze tří zástupců rodu *Bootanelleus* v druhé větvi (II) linie 1 neměly uzly ve fylogenetickém stromu dobrou podporu (bootstrap 50, resp. 60).

Ostatní rody linie 1 vyšly jako monofyletické. Nový nepopsaný rod (viz obr. 21), snadno morfologicky definovaný od zbytku rodů (mj. tvar, velikost a průhlednost stigma, uspořádání sít na pronotu atd.), je sesterský rodu *Ianistigmus* (větev II).



Obr. 20 a 21: 20, samec rodu *Ianistigmus* JBOH00014\_0101 (vlevo); 21, nově objevený rod JBOH00033\_0101 (vpravo, samice) (Foto: Petr Janšta).

Linie 2 zahrnuje rody *Bootanomyia*, *Malostigmus*, *Westralianus*, část druhů rodu *Bootanelleus* a *Megastigmus* a potenciálně nový rod (JBOH00046\_0101). Rody *Malostigmus* a *Westralianus* jsou monofyletické, sesterské a morfologicky podobné. Většinu linie 2 tvoří (zdánlivě parafyletický) rod *Bootanomyia*, který se rozdělil na palearktickou a australskou linii. Mezi tento rod se ale zařadily i druhy prozatím řazené do rodu *Megastigmus* a některé druhy určené (na základě přítomnosti pouze jednoho zubu na clypeu) do rodu *Bootanelleus*.





Obr. 22 a 23: 22, samice JBOH00074\_0101 pravděpodobně nového rodu podobného rodu *Paramegastigmus* (vlevo, foto: Petr Janšta); 23, samice JRAS08291\_0201 (možná dalšího nového rodu), který mu vyšel jako sesterský (vpravo, foto: J.-Y. Rasplus).

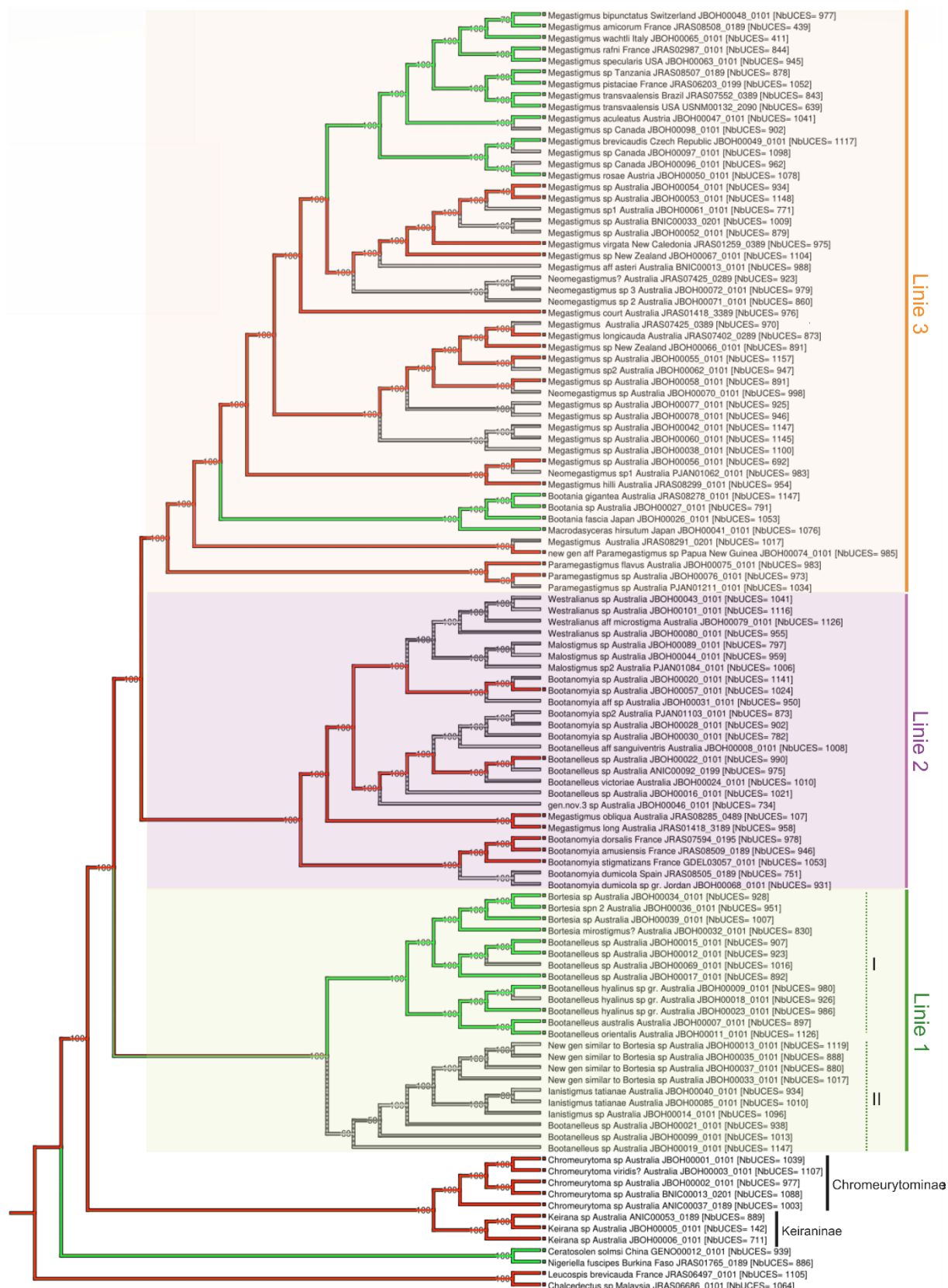
V linii 3 nalezneme rody *Bootania*, *Macrodasyceras*, *Megastigmus*, *Neomegastigmus* a *Paramegastigmus*. Rod *Paramegastigmus* je monofyletický a sesterský ostatním rodům linie 3. Stejně tak je monofyletický rod *Bootania*, který se jeví jako sesterský rodu *Macrodasyceras*. Rod *Neomegastigmus* se zdá být ovšem polyfyletický a rod *Megastigmus* parafyletický. V této linii se také objevuje pravděpodobně nový rod podobný rodu *Paramegastigmus*, který je od něj však výrazně morfologicky odlišen – zejména skulpturou, tvarem propodea a tvarem tykadlových článků (jedinec JBOH00074\_0101 – viz obr. 22 a 23). Všichni zástupci linie 3 mají clypeus se dvěma laloky/zuby.

#### b) Potravní strategie

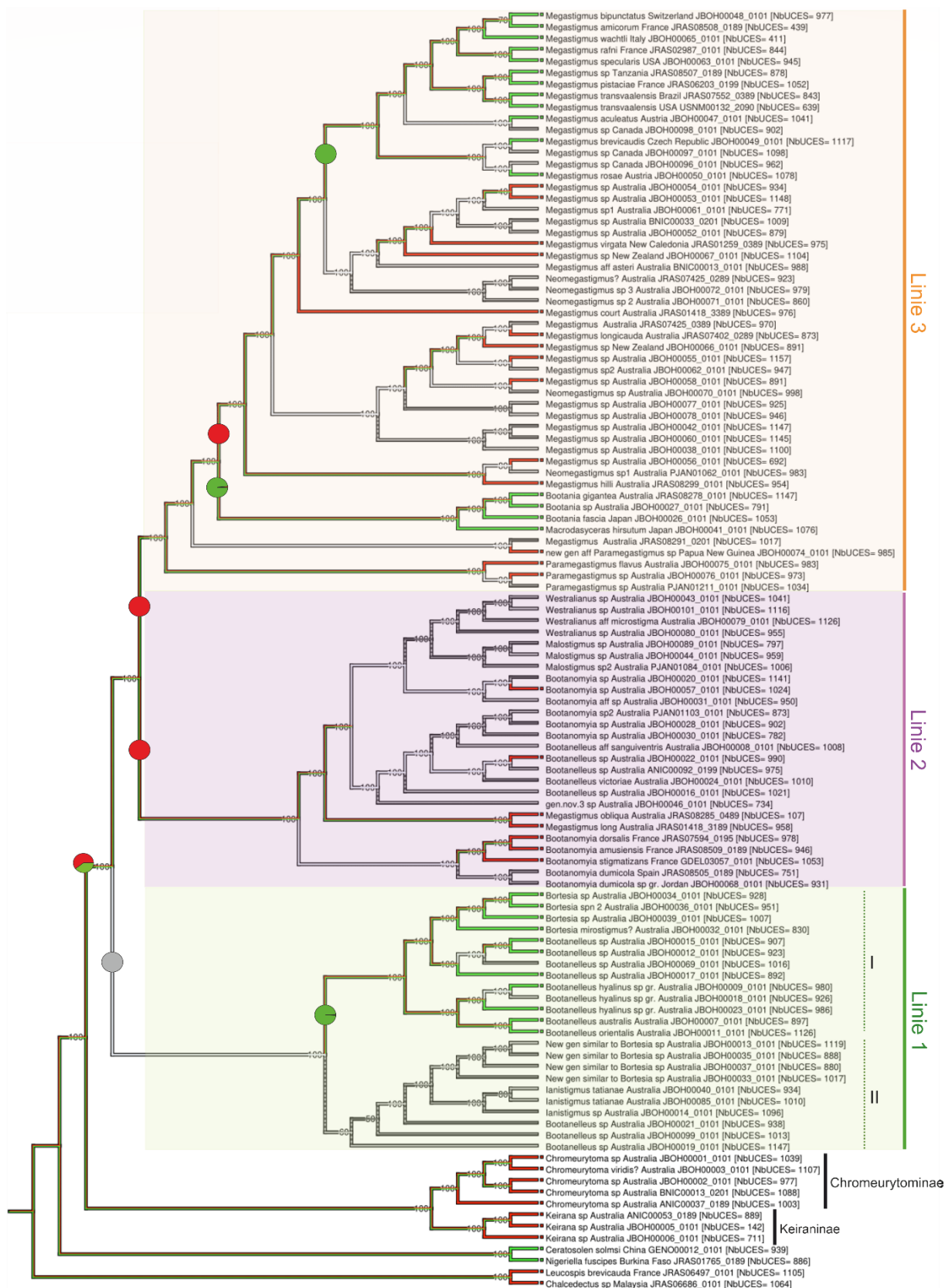
U celkem 43 ze 100 vzorků zástupců čeledi Megastigmidae použitých ve finálním datasetu byla známa potravní strategie buď z literatury, nebo z údajů o chovu (viz obr. 26). U dalších 5ti se předpokládá parazitoidismus kvůli jejich asociaci s fíky (viz Příloha 1 a 2).

Na základě výsledků je zřejmé, že v rámci čeledi Megastigmidae došlo nejméně třikrát k přechodu z parazitoidismu k fytofáгии, přičemž na základě analýzy metodou jak MP, tak i ML (s proporční pravděpodobností 0.61) v programu Mesquite je právě parazitoidismus původní strategií čeledi (viz obr. 24 až 26).

Linie 1 sestává ze dvou větví (I a II). Jedna je tvořena skupinou druhů, u nichž se domníváme, že jsou všichni fytofágní. Její zástupci spadají buď do rodu *Bortesia*, který je hálkotvorný na rostlinách čeledi Proteaceae, nebo do rodu *Bootanelleus* vázaného na čeleď Casuarinaceae. Druhy *B. australis*, *B. orientalis* a stejně tak i jedinec JBOH00017\_0101 (*Bootanelleus* sp.) byli vychováni z šišek rodu *Casuarina*. Naproti tomu jedinci *B. hyalinus* sp. gr. byli vychováni z hálek na rodu *Casuarina*, zato JBOH00012\_0101 (*Bootanelleus* sp.)

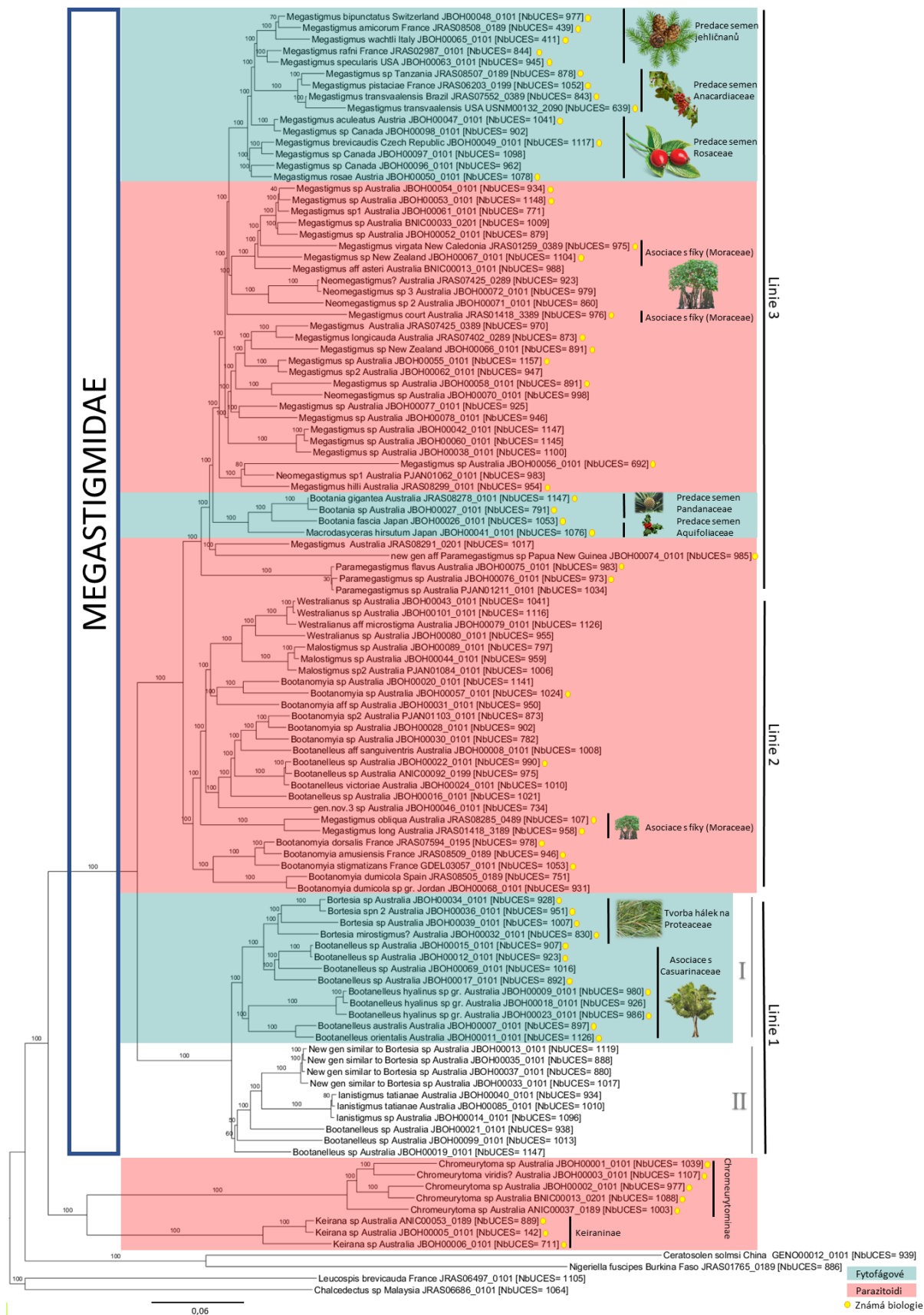


Obr. 24: Analýza původních potravních strategií v jednotlivých liniích čeledi Megastigmidae pomocí metody maximální parsimonie (MP) v programu Mesquite. Fytofágní linie jsou značeny zeleně, parazitické červeně, s neznámou biologii šedě.



Obr. 25: Analýza původních potravních strategií v jednotlivých liniích čeledi Megastigmidae pomocí metody maximální věrohodnosti (ML) v programu Mesquite. Fytofágní linie jsou značeny zeleně, parazitické červeně, s neznámou biologií šedě. Koláčové grafy zobrazují proporční pravděpodobnosti původní strategie dané větve.





Obr. 26: Znárodnění předpokládaného rozložení potravních strategií v rámci čeledi Megastigmidae. Fytofágové (potvrzení či domnělí) jsou vyznačeni modrozeleně, parazitoidi (potvrzení či domnělí) jsou vyznačeni červeně, nepodbarvené jsou ponechány rody s neznámou strategií a vzdálenější „outgroups“. Kolečkem jsou označeny druhy se známou strategií (zdroje k obrázkům viz Internetové zdroje a databáze).

a JBOH00015\_0101 (*Bootanelleus* sp.) z hálek na rodu *Allocasuarina*, přesto jsou považováni za fytofágy (Taylor, osobní sdělení).

Potravní strategie druhé větve (II) není doposud vůbec známa, nicméně jedinci byli smýknuti na čeledi Casuarinaceae (Janšta & Böhmová, vlastní pozorování). Sem se zařadil rod *Ianistigmus*, nově objevený nepopsaný rod a stejně tak i někteří zástupci, jež byli klasifikováni do rodu *Bootanelleus*. Původní strategie linie 1 tak není kvůli nedostatku údajů o biologii zástupců z větve II zřejmá (viz obr. 24 až 26).

Linie 2 obsahuje pouze druhy, u nichž, pokud známe jejich biologii, se jedná vždy o parazitoidy (biologie je známa ale pouze u 7 z 26 zástupců – viz obr. 26). V rámci této linie se též minimálně jednou objevila asociace s fíky. Parazitoidismus je na základě MP i ML původní strategií této linie (pro ML s proporční pravděpodobností téměř 1.0).

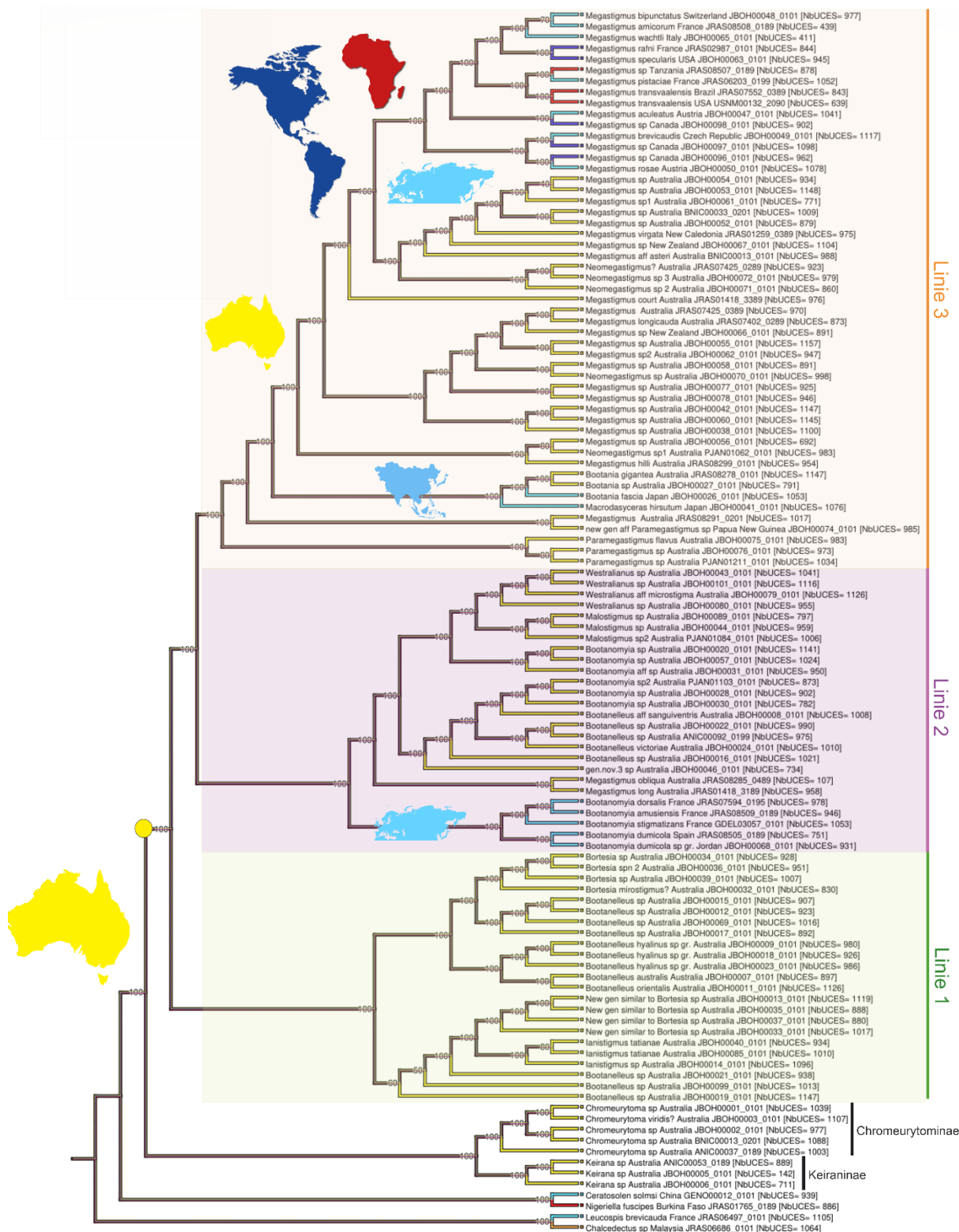
Uvnitř linie 3 došlo k nejvíce přeskokům mezi způsoby výživy. Parazitické jsou v této linii rody *Paramegastigmus* a *Neomegastigmus*. Fytofágie se zde objevila dvakrát (viz obr. 24 až 26). K jednomu přeskoku k predaci semen došlo v kládu obsahujícím rody *Macrodasyceras* (na čeledi Aquifoliaceae) a *Bootania* (na čeledi Pandanaceae). Podruhé vznikla semenožravost u mimoaustralských zástupců rodu *Megastigmus*, a to postupně na různých čeledích. Předek linie 3 byl pravděpodobně parazitický (dle analýzy ML s proporční pravděpodobností téměř 1.0).

V současném taxonomickém pojetí rodu *Megastigmus* (dle fylogeneze je ale parafyletický) lze tento rod považovat také za původně parazitický (dle analýzy ML s proporčním pravděpodobností téměř 1.0). Mezi parazitoidy tohoto druhu se alespoň dvakrát objevila asociace s fíky. V linii, která opustila Austrálii, došlo k přeskoku k fytofágii. V tomto souboru druhů vytvořily parafyletickou skupinu druhy predující semena čeledi Rosaceae. Druhy vázané na Anacardiaceae formují monofylum. Stejně tak je monofyletická i skupina vázaná na nahosemenné rostliny, která tvoří korunovou linii rodu. Asociace s jehličnany se tedy vyvinula pravděpodobně až po asociaci s krytosemenými (viz obr. 26).

### c) Geografický původ

Jako původní oblast výskytu čeledi Megastigmidae vyšla jednoznačně Austrálie, což bylo podpořeno analýzou MP i ML v programu Mesquite (viz obr. 27 a 28). Australská oblast takto vyšla v ML analýze s proporční pravděpodobností téměř 1.0. Ostatní šíření mimo Austrálii jsou podrobněji popsána v kapitole Diskuze.





Obr. 28: ML analýza pôvodného rozšírení v programu Mesquite. Barvy vetví značí pôvod daného taxonu: žltá – austrálska oblasť, oranžová – orientálna oblasť, svetle modrá – palearktická oblasť, tmavě modrá – nearktická oblasť, červená – afrotropická oblasť. Mapky geografických oblastí značí miesta šírení jednotlivých línií v rámci Megastigmidae (zdroje obrázků viz Internetové zdroje a databáze). Koláčový graf zobrazuje proporčnú pravdepodobnosť austrálskeho pôvodu čeledi.

## 6) Diskuze

### a) Aplikace UCE metody

Jak už bylo zmíněno výše, UCE metoda byla už dříve úspěšně použita pro objasňování fylogeneze blanokřídlého hmyzu, a to i za pomoci velmi drobného (až 0,5 mm – Cruaud et al. 2020; Rasplus, osobní sdělení) či velmi starého (až 121 let – Blaimer et al. 2016) muzejního materiálu, což je důležité pro výzkum málo známých či vzácných skupin. Laboratorní protokoly byly navíc optimalizovány na maximální výtěžnost DNA a k tomu obsahují několik kroků, kde se dá část DNA použít jako záložní pro případ selhání.

I v této práci byly úspěšně použity staré a drobné vzorky, z nichž nejstarší pocházel z roku 1972. Z několika dalších starých vzorků se ovšem DNA izolovat nepodařilo, do budoucna by nejspíš bylo dobré takto staré vzorky nevystavovat sonikaci, jelikož DNA v nich je už hodně fragmentovaná.

Výsledky této práce tedy rozhodně potvrzují značnou aplikovatelnost UCE metody pro fylogenetické studie blanokřídlého hmyzu, a to (v případě Chalcidoidea) dokonce i za použití původního setu 2749 sond od Faircloth et al. (2015).

### b) (Staro)nové poznatky o fylogenezi čeledi Megastigmidae

Výsledky této práce podporují několik již dříve existujících hypotéz ohledně fylogeneze čeledi Megastigmidae. Za prvé vůbec její samotnou monofylii, která byla už mnohokrát podpořena předtím (Bouček 1988a, Grissell 1995, Heraty et al. 2013, Janšta et al. 2018, Munro et al. 2011).

K určení nejbližší příbuzné sesterské skupiny tato práce sice nemá dostatečně velký sampling „outgroups“, nicméně se shoduje s nejnovějšími výsledky mnohem obsáhlejších předběžných studií nadčeledi Chalcidoidea metodou AHE (Heraty et al., nepublikovaná data) a UCE (Cruaud & Rasplus, nepublikovaná data zahrnující přes 600 taxonů celé nadčeledi včetně zástupců všech čeledí, podčeledí i většiny tribů). Právě na jejich základě byly zvoleny jako „outgroups“ i podčeledi Keiraninae a Chromeurytominae (oboje zatím klasifikovány jako Pteromalidae, obr. 29 a 30), které jsou dle výsledků nepublikovaných dat i dle výsledků této práce nejbližšími příbuznými čeledi Megastigmidae a dohromady tvoří taxon sesterský čeledi.

Čeď Megastigmidae s nimi sice nesdílí žádné zjevné morfologické synapomorfie, nicméně jsou všechny tři skupiny parazitoidy hálkotvorného hmyzu a původem z Austrálie



(Bouček 1988a a 1988b, Goolsby et al. 2001), což jsou ovšem plesiomorfní znaky (Bouček 1988a).



Obr. 29 a 30: Nejbližší příbuzní čeledi Megastigmidae, rody *Chromeurytoma* (29, vlevo, samice) a *Keirana* (30, vpravo, samice) (Foto: J.-Y. Rasplus).

Dále jsou podle těchto předběžných informací (Cruaud & Rasplus, nepublikovaná data) Megastigmidae + (Chromeurytominae + Keiraninae) blízce příbuzní podčeledím Asaphinae a Ormocerinae (též zatím Pteromalidae), do jejichž blízkosti byla čeleď Megastigmidae kladena už dříve (Munro et al. 2011). V tomto bodě je ovšem nutno opět upozornit na zcela jasnou polyfylii čeledi Pteromalidae (Cruaud & Rasplus, nepublikovaná data; Heraty et al. 2013; Heraty et al., nepublikovaná data; Munro et al. 2011).

Z nově získaných dat o fylogenezi čeledi Megastigmidae je ale především zcela zřejmé, že celá čeleď potřebuje kompletní taxonomickou revizi. Několik rodů totiž tvoří parafyletické (*Megastigmus* a *Bootanomyia*) či polyfyletické (*Bootanelleus* a *Neomegastigmus*) taxony. Ukazuje se tedy, že mnoho znaků používaných k současnému rozlišení rodů v dostupné taxonomické literatuře je konvergentních a znaky definující rody bude tudíž potřeba ještě nalézt.

V linii 1 byl problematický zejména rod *Bootanelleus*. Vzhledem k nízkým podporám (bootstrap 50, resp. 60) u těch druhů určených do rodu *Bootanelleus*, které vyšly jako sesterské novému rodu a rodu *Ianistigmus* (větev II), lze usuzovat na množství zatím nepopsané druhové diverzity v této části fylogenetického stromu čeledi. Je také možné, že po přidání dalších taxonů by se některé z těchto exemplářů ocitly ve větvi I či by obecně stoupily podpory v této části stromu.

Tyto taxony jsou také ve dvou případech zastoupeny samci, u nichž je obtížné rozlišovat jednotlivé druhy kvůli omezenému počtu morfologických znaků. U mnoha zástupců čeledi nejsou samci vůbec známi (Bouček 1988a). I proto byl vzorek JBOH00014\_0101 původně

považován za samce rodu *Bootanelleus*, i když se nakonec ukázalo, že se jedná o dosud neznámého samce rodu *Ianistigmus*.

Oproti tomu druhy *B. orientalis* a *B. australis* a komplex *B. hyalinus* sp. gr. jsou dobře odlišitelné od zbývajících druhů, a dokonce by mohly být považovány za samostatné rody.

Obtíže s klasifikací jedinců do rodů nastaly i v linii 2. Exempláře určené do rodu *Bootanelleus* byly takto zařazeny na základě přítomnosti pouze jednoho zubu na clypeu. Jedinci určení jako *Bootanomyia* mají na clypeu dva zuby. Přesto se obě tyto skupiny zařadily do jednoho (ač parafyletického) kládu. Z toho lze usuzovat, že počet zubů na clypeu není dobrým určovacím znakem mezi rody *Bootanelleus* a *Bootanomyia*. Stejně tak není dobrým determinačním znakem kovové zbarvení, jak se tradičně uvádělo např. v Bouček (1988a) a Doğanlar (2011b).

V rámci rodu *Bootanomyia* byla celá jedna větev tvořena palearktickými druhy, které napadají larvy žlabatek, zatímco ostatní exempláře byly australského původu bez známé biologie (Bouček 1988a, Doğanlar 2011b, Grissell 1999) (viz obr. 27 a 28). Tato parafylie byla podpořena již dříve ve studii Janšta et al. (2018). Současně tato studie (Janšta et al. 2018) navrhuje rozdělit rod *Bootanomyia* na dva rody. Samotné jméno rodu *Bootanomyia* by na základě pravidel zoologické nomenklatury připadlo australské linii. Prvním druhem pojmenovaným přímo tímto rodovým jménem byla totiž orientální *B. gemma* (Noyes 2020), u které lze usuzovat na spřízněnost s australskými druhy. Palearktičtí zástupci by pak získali zcela nové jméno, jelikož první popsáný druh této linie (*B. dorsalis*) byl popsán v již obsazeném rodě *Ichneumon*.

Zástupci linie 2 původně určení dle literatury (Bouček 1988a) jako druhy rodu *Megastigmus* jsou asociováni s fíky a mají trochu neobvyklé morfologické rysy, vzniklé pravděpodobně jako důsledek jejich specifického způsobu života (Rasplus, osobní sdělení). Fylogeneticky zajímavý je i vzorek JBOH00046\_0101, který by také mohl být novým rodem.

I linie 3 odhalila potenciálně nový, dobře morfologicky odlišitelný rod (zastoupený pouze jediným exemplářem s kódem JBOH00074\_0101), který je podobný rodu *Paramegastigmus*. I tento vzorek opět poukazuje na pravděpodobně podhodnocenou diverzitu čeledi, která ztěžuje interpretaci výsledků o její evoluci.

Z výsledné fylogeneze linie 3 je dále zjevné, že rod *Neomegastigmus* je polyfyletický. Znak používaný k jeho odlišení od rodu *Megastigmus* (tmavé pole na předním křídle – Bouček 1988a) tedy není patrně dobrým rozlišovacím znakem. Jako monofyletický tedy nevyšel ani rod *Megastigmus*, vedle jehož zástupců se druhy určené do rodu *Neomegastigmus* umístily.

Dále se odštěpuje fytofágní linie obsahující rod *Bootania* a jemu sesterský rod *Macrodasyceras*. Jak už bylo zmíněno výše, v minulosti byly tyto rody na základě morfologie shrnuty do jediného rodu (Bouček 1988a), ovšem následně opět rozděleny (Grissell & Desjardins 2002). Z této práce je patrné, že k sobě mají opravdu blízko, nicméně každý preduje semena jiné čeledi; *Bootania* plody čeledi Pandanaceae a *Macrodasyceras* plody čeledi Aquifoliaceae. Taktéž se liší výrazně jinou velikostí těla (Grissell & Desjardins 2002, Kamijo 1962).

Co se týče fylogeneze rodu *Megastigmus*, byla podpořena z minulosti již známá (na základě sekvenace dvou genů) monofylie druhů rodu *Megastigmus* spjatých s čeledí Anacardiaceae (Roques et al. 2016), stejně tak i monofylie skupiny napadající jehličnany (Auger-Rozenberg et al. 2006). V této práci byl však sampling druhů rodu *Megastigmus* parazitujících na nahosemenných rostlinách malý (pouze 5 z cca 50 druhů) a na rozdíl od starší studie (Auger-Rozenberg et al. 2006) vztahy uvnitř tohoto kládu neřeší. Tato početná větev by se mohla stát samostatným rodem, nicméně zatím nejsou známy morfologické znaky, které by ji odlišily od ostatních fytofágních zástupců. Zástupci fytofágní linie rodu *Megastigmus* se vyznačují větším počtem celkově kratších sít na hlavě a na hrudi. Oproti tomu mají parazitoidi (potvrzení či domnělí) menší počet sít, které jsou ale delší (Janšta & Böhmová, vlastní pozorování). Znaky na odlišení jednotlivých linií v rámci parazitoidních zástupců rodu zatím nebyly nalezeny.

### c) Evoluce potravních strategií

Z prvotní studie (Janšta et al. 2018) u čeledi Megastigmidae i z výsledků této práce je zjevné, že Megastigmidae jsou unikátní skupinou vosiček se zástupci, u nichž docházelo ke změnám potravní strategie s vyšší četností, a to z parazitoidismu k fytofágii a z prosté fytofágie ke komplexnější tvorbě hálek. Přejít k býložravosti se dle získaných dat uskutečnil v rámci čeledi minimálně třikrát, jednou v linii 1 a dvakrát nezávisle v linii 3. Alespoň jednou se v rámci fytofágní linie dokonce objevila tvorba hálek. Data neukazují, že by kdy v této čeledi došlo k přechodu z fytofágie zpět k parazitoidismu.

Jak už bylo nastíněno, taková frekvence tranzic ve způsobu výživy larev (a to i v rámci jednoho rodu) je neobvyklá. K přechodu k fytofágii v rámci blanokřídlého hmyzu zpravidla docházelo u předka dané skupiny, jehož potomci byli následně (téměř) všichni fytofágní (většina širopasých, Anthophila, Masarinae, Cynipidae, Agaonidae) (Cruaud et al. 2012, Flores et al. 2005, Peters et al. 2017, Ronquist 1999, Sharkey 2007, Whitfield 2003). Pouze ojedinělé a na sobě vesměs nezávislé byly přeskoky u nadčeledi Ichneumodoidea (Flores et al.

2005, Chavarría et al. 2009, de Macedo & Monteiro 1989, Perioto et al. 2011, Zaldívar-Riverón et al. 2007 a 2014).

Uvnitř některých čeledí chalcidek (Eulophidae, Eurytomidae, Ormyridae, Pteromalidae, Tanaostigmatidae a Torymidae) docházelo k takovým přeskokům častěji (Gómez et al. 2017, Heraty et al. 2013, Janšta et al. 2018, La Salle 2005). Avšak škálu strategií a přeskoků mezi různými strategiemi (parazitoidními i fytofágními) srovnatelnou s čeledí Megastigmidae nalezneme snad jen u podčeledi Tetrastichinae (Eulophidae) a částečně také u Eurytomidae (La Salle 2005). Nicméně to, zda fytofágie vede ke zrychlení nebo naopak zpomalení speciace a tím i k evoluční slepé uličce, nebylo zatím testováno.

Diverzita čeledi (a s tím i způsobů výživy) však bude mnohem vyšší (Janšta & Böhmová, vlastní pozorování), než je známo. Kvůli tomu byl sampling nedostatečný, mnoho linií ve fylogenezi chybí či jsou zastoupeny pouze jedním exemplářem, což ztěžuje vytváření jednoznačných závěrů.

Co se týče původní potravní strategie čeledi, názory se v minulosti lišily. Vzhledem k tomu, že většina zástupců s prokázaným způsobem výživy larev patřila mezi fytofágy, byla fytofágie navržena jako ancestrální způsob výživy (Grissell 1995). Jediná dosud existující podrobnější studie (Janšta et al. 2018) pouze poukazuje na to, že se parazitoidismus vyvinul minimálně dvakrát nezávisle na sobě, například v rodech *Bootanomyia* a *Neomegastigmus*. Jak již ale bylo zmíněno výše, ve studii Janšta et al. (2018) bylo použito pouze 7 z celkových 12 rodů a navíc jednotlivé hlubší uzly fylogenetického stromu neměly dostatečnou podporu. Nicméně vzhledem k pozici parazitického rodu *Bootanomyia* (jako sesterského ostatním rodům čeledi) tato práce naznačila, že původní strategií by mohl být parazitoidismus. K takovému závěru se přiklání i data z této práce na základě mapování potravních strategií v programu Mesquite metodou maximální parsimonie a maximální věrohodnosti (obr. 24 a 25).

Na ancestrálnost parazitoidismu se dá mimo jiné usuzovat podle biologie nejbližších „outgroups“. Druhy rodu *Chromeurytoma* jsou parazitoidy či hyperparazitoidy blanokřídlých či dvoukřídlých v hálkách (Goolsby et al. 2001; Janšta & Böhmová, vlastní pozorování), rod *Keirana* je též parazitický v hálkách a to u červců (Bouček 1988b).

Parazitoidismus se ukázal být původní potravní strategií i v rodu *Megastigmus*. Tato strategie je možná zastoupena u všech v této práci zkoumaných druhů z australské oblasti. S jistotou to však vzhledem k omezenému množství informací ohledně biologie daných druhů tvrdit nelze. V tomto rodu došlo k jednomu přechodu k fytofágii, a to u mimoaustralských zástupců. Dle výsledků této práce vytvořily druhy vázané na čeleď Rosaceae parafylum,

druhy spjaté s čeledí Anacardiaceae monofylum a korunová linie je tvořena druhy napadajícími jehličnany. Lze tedy říct, že původní je u fytofágních zástupců rodu asociace s krytosemennými rostlinami a asociace nahosemennými rostlinami je odvozená. Sampling však bohužel neobsahoval druhy rodu *Megastigmus* asociované s mnoha dalšími čeleděmi krytosemenných rostlin (Fabaceae, Hamamelidaceae, Malvaceae a Rhamnaceae), u kterých se jinak vyskytuje (Roques et al. 2016). Není tedy možné si utvořit přesnější obrázek o evoluci hostitelských asociací v tomto rodu. Bylo by však vhodné takové zástupce zahrnout do dalších studií.

Pozoruhodností je, že mezi parazitoidními zástupci čeledi se minimálně třikrát objevila asociace s fíky. Tento jev není u nadčeledi Chalcidoidea nikterak výjimečný (Cook & Rasplus 2003). Na prostředí sykoníí fíků se krom známých fíkových vosiček (Agaonidae: Agaoninae), které jsou hálkotvornými opylujícími mutualisty, v průběhu evoluce adaptovalo hned několik dalších nepříbuzných skupin, které na této symbiotické asociaci těží. Jedná se konkrétně o Sycophaginae (Agaonidae), Epichrysomallinae, Otitesellinae, Sycoecinae, Sycoryctinae (všichni Pteromalidae) a některé zástupce čeledi Ormyridae. Ve fících mohou tyto skupiny tvořit hálky, parazitovat fíkové či jiné hálkotvorné vosičky, nebo být inkvilíny v hálkách (Bouček 1988a, Cook & Rasplus 2003, Cruaud et al. 2011, Narendran et al. 2007, Noyes 2020). Nicméně i mezi těmito skupinami nalezneme výjimky v podobě opylujících mutualistů (Jousselin et al. 2001).

Mimo Chalcidoidea se inkvilinnímu životu v hálkách napadených květů fíků přizpůsobil i lumčík rodu *Psenobolus* (Braconidae) (van Achterberg & Marsh 2002, Ramirez & Marsh 1996).

Avšak jakou potravní strategii ve fících zaujímají druhy v tomto souboru, zůstává neznámé. Sběrů bylo totiž na jasné určení biologie příliš málo. Nejjednodušší a nejpravděpodobnější vysvětlení je, že se jedná o parazitoidy fíkových vosiček (Rasplus, osobní sdělení), čemuž by nasvědčoval fakt, že se vyskytují v kládu spolu s parazitoidními druhy a mají velmi dlouhé kladélko, jako například parazitoidi podčeledi Sycophaginae (Cruaud et al. 2011).

I v linii 1 panovalo několik nejasností ohledně biologie některých rodů. Asi nejobtížnější je vysvětlení biologie u rodu *Bootanelleus*. Všechny druhy ve větvi I v linii 1 v tomto souboru jsou považovány za fytofágní (Taylor, osobní sdělení). *B. orientalis*, *B. australis* a *Bootanelleus* sp. (JBOH00017\_0101) jsou prokázány fytofágové na *Casuarina equisetifolia*, resp. *C. cunninghamiana* (Bouček 1988a; Taylor, osobní sdělení). Jiné druhy byly vychovány z hálek na čeledi Casuarinaceae (buď na rodu *Casuarina* v případě *B. hyalinus* sp. gr. nebo

rodu *Allocasuarina* u *Bootanelleus* sp. JBOH00012\_0101 a *Bootanelleus* sp. JBOH00015\_0101). V literatuře existují ovšem i záznamy o údajně parazitických zástupcích tohoto rodu (Bouček 1988a, Mo & Stevens 2014). Další možností je také to, že zástupci rodu *Bootanelleus* vychovaní z hálek jsou hálkotvorní. Je tedy možné, že v této linii došlo k mnohem více potravním přeskokům, než vyplývá z dat této práce.

Ani biologie rodu *Bortesia* nebyla nikdy plně prozkoumána. Dle práce Riek (1966) se jedná o tvůrce hálek, ale v této studii byly exempláře pouze vychovány z pupenů na rostlině *Hakea*. To se potvrdilo i rámci výzkumu pro tuto práci (Janšta & Böhmová, vlastní pozorování). Samice byly pozorovány při kladení vajíček do pupenů, mladých větviček a listů rostliny *Hakea* a experimentálně bylo dokázáno, že se líhnou jak ze zvětšených pupenů (hálek), tak i z větviček a listů rostliny (bez zvláštních zduřenin).

Největší neznámou však zůstává biologie větve II linie 1. U žádného ze zástupců není znám způsob výživy jeho larev, nebylo tedy ani možné určit pravděpodobnou původní potravní strategii linie 1 (viz obr. 24 a 25). Lze však alespoň konstatovat, že tito zástupci byli zpravidla smýknuti na čeledi Casuarinaceae (Janšta & Böhmová, vlastní pozorování). Pravděpodobně tedy s ní budou nějakým způsobem spjati podobně jako mnoho jiných zástupců větve I linie 1.

#### d) Geografický původ

Nejasnosti panovaly i ohledně geografického původu čeledi. Austrálie, jakožto místo největší rodové i druhové diverzity čeledi (Bouček 1988a), se jeví nejpravděpodobnějším kandidátem. V rozporu s tím bylo zjištění ve studii Janšta et al. (2018), která měla ovšem značně omezený druhový sampling, že jedna linie pravděpodobně parafyletického rodu *Bootanomyia*, která je rozšířena pouze v palearktické oblasti, ve studii vyšla jako sesterská ke zbytku čeledi Megastigmidae, jak už bylo zmíněno výše. Avšak i tato studie se přiklonila spíše k australskému původu čeledi.

V této práci je rozhodně podpořen australský původ čeledi na základě mapování biogeografie druhů pomocí MP a ML analýzy v programu Mesquite (viz obr. 27 a 28). Čeledi Megastigmidae sesterské podčeledi Keiraninae a Chromeurytominae jsou též australské (Bouček 1988b, Goolsby et al. 2001).

Dle získaných výsledků a údajů z literatury se zdá, že v průběhu evoluce čeledi došlo možná až 5x k přirozenému (člověkem neovlivněnému) rozšíření výskytu mimo australskou oblast. Jednou nebo dvakrát to bylo v linii rodu *Bootanomyia* napadající žlabatky (australští zástupci rodu nemají známé hostitele). Zde došlo k osídlení palearktické a částečně orientální

oblasti (Doğanlar 2011b, Grissell 1999). Další přechod se odehrál ve fytofágní linii rodů *Bootania* a *Macrodasycceras*, kde došlo k rozšíření opět do orientální oblasti (s přesahem do Oceánie) a východopalearktické oblasti (Grissell & Desjardins 2002, Kamijo 1962, Yao et al. 2017). Přechod se odehrál i u fytofágní linie rodu *Megastigmus*, která se rozšířila téměř po celém světě. Naopak všichni známí parazitoidi tohoto rodu pocházejí z australské nebo přilehlé orientální oblasti (Auger-Rozenberg et al. 2006, Bouček 1988a, Caicedo et al. 2015, Doğanlar 2015, Grissell 1999, Narendran et al. 2003 a 2010, Roques et al. 2016). Poslední přechod se týká rodu *Mangostigmus*, který osídlil přilehlou orientální oblast (Bouček 1988a, Narendran et al. 2004, Narendran & Vijayalaksmi 2007). Rod *Mangostigmus* byl ovšem jediným zcela chybějícím rodem v této práci, tudíž není známa jeho pozice ve fylogenetickém stromu čeledi. V případě evropského druhu určeného do rodu *Westralianus* (Doğanlar 2011a) se pravděpodobně jedná o chybu a nikoli další přechod do palearktické oblasti.

Hypotézy o přirozeném šíření jednotlivých taxonů mimo Austrálii bohužel nelze podpořit datováním, jelikož neexistuje žádná fosilie zástupce této čeledi (Janšta et al. 2018). Do budoucna bude tedy nutné pro zjištění stáří skupiny použít externí kalibrační body nebo dohledat příslušné fosilie čeledi.

## 7) Závěr

Získaná fylogeneze na základě sekvenace tzv. „ultraconserved elements“ (UCEs), s využitím 100 zástupců v 11 z 12 dosud platných rodů (vybraných s přihlédnutím k potravní strategii a biogeografii jednotlivých druhů), je velmi robustní a je vůbec první komplexnější fylogenetickou studií čeledi Megastigmidae. Finální dataset obsahuje celkem 1210 osekvenovaných lokusů v délce cca 570.000 párů bazí, většina uzlů byla podpořena bootstrapem 100.

Výsledky ukazují, že čeleď lze rozdělit na tři hlavní větve. Jedna je tvořena jednak pravděpodobně fytofágní linií s druhy (rodu *Bootanelleus*) asociovanými s čeledí Casuarinaceae a druhy tvořícími hálky na Proteaceae (rod *Bortesia*), ale též druhou linií bez známé biologie zahrnující kromě rodu *Ianistigmus* (u kterého byl objeven dosud neznámý samec) i nový dosud nepopsaný rod. Další větev nejspíš zahrnuje pouze parazitoidní druhy (rody *Bootanomyia*, *Malostigmus* a *Westralianus*). V rámci třetí větve (zahrnující rody *Macrodasyceras*, *Bootania*, *Paramegastigmus*, *Megastigmus* a *Neomegastigmus*) vznikla fytofágie minimálně 2x nezávisle na sobě. Jednou v linii zahrnující rod *Macrodasyceras*, predující semena čeledi Aquifoliaceae, a rod *Bootania*, vyvíjející se v semenech čeledi Pandanaceae. Podruhé došlo k přechodu k býložravému způsobu života v nejbohatším rodu *Megastigmus* u mimoaustralských zástupců. Zde se odehrál přesun z původně parazitoidních předků na krytosemenné rostliny a následně na semena jehličnanů.

Z výsledků je patrné, že fytofágie se v rámci čeledi Megastigmidae vyvinula alespoň třikrát. Minimálně třikrát nezávisle na sobě se též vyskytla asociace s fíky. Na základě výsledků této práce a znalostí o potravních strategiích skupin použitých jako „outgroups“ lze též usuzovat, že společný předek čeledi byl parazitický.

Výsledné fylogenetické hypotézy rovněž poukazují na australský původ čeledi, nicméně s opakovaným šířením do jiných částí světa.

V neposlední řadě je zřejmé, že celá skupina vyžaduje kompletní taxonomickou revizi rodů (mnoho z nich je očividně parafyletických, polyfyletických či dosud neobjevených) a druhových skupin, nalezení definujících morfologických znaků pro nové rody a celkové prohloubení znalostí o jejich potravní ekologii.

Do budoucna by bylo též vhodné doplnit stávající fylogenezi o další chybějící taxony (např. rod *Mangostigmus* či druhy rodu *Megastigmus* spjaté s čeleděmi rostlin nezahrnutými do této práce) pro získání ještě ucelenějšího obrazu o evoluci čeledi.



## 8) Literatura

- van Achterberg C, Marsh PM (2002) Revision of the genus *Psenobolus* Reinhard (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae). *Zoologische Mededelingen* 76: 1–25.
- von Aderkas P, Rouault G, Wagner R, Rohr R, Roques A (2005) Seed parasitism redirects ovule development in Douglas fir. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 1491–1496.
- Ahituv N, Zhu Y, Visel A, Holt A, Afzal V, Pennacchio LA, Rubin EM (2007) Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *PLoS Biology* 5: e234, 1906–1911.
- Askew RR, Plantard O, Gómez JF, Nieves MH, Nieves-Aldrey JL (2006) Catalogue of parasitoids and inquiline in galls of Aylacini, Diplolepidini and Pediaspidini (Hym., Cynipidae) in the West Palaearctic. *Zootaxa* 1301: 1–60.
- Auger-Rozenberg M-A, Kerdelhué C, Magnoux E, Turgeon J, Rasplus J-Y, Roques A (2006) Molecular phylogeny and evolution of host-plant use in conifer seed chalcids in the genus *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae). *Systematic Entomology* 31: 47–64.
- Auger-Rozenberg M-A, Roques A (2012) Seed wasp invasions promoted by unregulated seed trade affect vegetal and animal biodiversity. *Integrative Zoology* 7: 228–246.
- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304: 1321–1325.
- Blaimer BB, Lloyd MW, Guillory WX, Brady SG (2016) Sequence capture and phylogenetic utility of genomic ultraconserved elements obtained from pinned insect specimens. *PLoS ONE* 11: e0161531, 1–20.
- Boivin T, Candau J-N (2007) Flow cytometric analysis of ploidy levels in two seed-infesting *Megastigmus* species: applications to sex ratio and species determination at the larval stage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 124: 125–131.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Bossert S, Murray EA, Almeida EAB, Brady SG, Blaimer BB, Danforth BN (2019) Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 130: 121–131.
- Bouček Z (1988a) Australasian Chalcidoidea (Hymenoptera). A biosystematic revision of genera of fourteen families, with a reclassification of species. *CAB International*.
- Bouček Z (1988b) Chalcidoidea “Down Under.” *Advances in Parasitic Hymenoptera Research, Proceedings of the II Conference on the Taxonomy and Biology of Parasitic Hymenoptera*: 273–282.
- Branstetter MG, Danforth BN, Pitts JP, Faircloth BC, Ward PS, Buffington ML, Gates MW, Kula RR, Brady SG (2017b) Phylogenomic insights into the evolution of stinging wasps and the origins of ants and bees. *Current Biology* 27: 1019–1025.

- Branstetter MG, Longino JT, Ward PS, Faircloth BC (2017a) Enriching the ant tree of life: enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other Hymenoptera. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 768–776.
- Caicedo G, Hanson P, Pujade-Villar YJ (2015) Microhimenópteros asociados a frutos de *Ilex kunthiana* (Aquifoliaceae) en un relicto de bosque andino en Bogotá, Colombia. *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 39: 343–358.
- Catresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.
- Cook JM (1993) Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* 71: 421–435.
- Cook JM, Rasplus J-Y (2003) Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 241–248.
- Cruaud A, Delvare G, Nidelet S, Sauné L, Ratnasingham S, Chartois M et al. (2020) Ultra-conserved elements and morphology reciprocally illuminate conflicting phylogenetic hypotheses in Chalcididae (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Cladistics*, 1-35.
- Cruaud A, Jabbour-Zahab R, Genson G, Kjellberg F, Kobmoo N, van Noort S et al. (2011) Phylogeny and evolution of life-history strategies in the Sycophaginae non-pollinating fig wasps (Hymenoptera, Chalcidoidea). *BMC Evolutionary Biology*, 11: 178.
- Cruaud A, Nidelet S, Arnal P, Weber A, Fusu L, Gumovsky A, Huber J, Polaszek A, Rasplus J-Y (2019) Optimized DNA extraction and library preparation for minute arthropods: Application to target enrichment in chalcid wasps used for biocontrol. *Molecular Ecology Resources* 19: 702–710.
- Cruaud A, Rønsted N, Chantarasuwan B, Chou LS, Clement WL, Couloux A et al. (2012) An extreme case of plant–insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology* 61: 1029–1047.
- Doğanlar M (2011a) A new species of *Westralianus* Boucek 1988 (Hymenoptera: Torymidae: Megastigminae) from Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 35: 23–27.
- Doğanlar M (2011b) Review of Palearctic and Australian species of *Bootanomyia* Girault 1915 (Hymenoptera: Torymidae: Megastigminae), with descriptions of new species. *Turkish Journal of Zoology* 35: 123–157.
- Doğanlar M (2015) Diagnosis of *Megastigmus* spp. (Hymenoptera: Torymidae) reared from galls of *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle, 2004, (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae), with description of a new species from South Africa. *Entomofauna-Zeitschrift für Entomologie* 36: 561–580.
- Doğanlar M, Hassan E (2010) Review of Australian species of *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae) associated with *Eucalyptus*, with descriptions of new species. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4: 5059–5120.

\*Doğanlar M, Huang Z-Y, Guo C-H, Lu W, Yang Z-D, Yang X-H, Zheng X-L (2017) A new species of *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae: Megastigminae) from China. *Munis Entomology & Zoology Journal* 12: 368–374.

Doğanlar M, Zaché B, Wilcken CF (2013) A new species of *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae: Megastigminae) from Brazil. *Florida Entomologist* 96: 196–199.

\*Doğanlar M, Zengin E (2018) A new species of *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae: Megastigminae) from Uşak, Turkey. *Munis Entomology & Zoology Journal* 13: 288–291.

Fabre J-P, Auger-Rozenberg M-A, Chalon A, Boivin S, Roques A (2004) Competition between exotic and native insects for seed resources in trees of a Mediterranean forest ecosystem. *Biological Invasions* 6: 11–22.

Faircloth BC (2017) Identifying conserved genomic elements and designing universal bait sets to enrich them. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1103–1112.

Faircloth BC, Branstetter MG, White ND, Brady SG (2015) Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. *Molecular Ecology Resources* 15: 489–501.

Faircloth BC, McCormack JE, Crawford NG, Harvey MG, Brumfield RT, Glenn TC (2012) Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology* 61: 717–726.

Faircloth BC, Sorenson L, Santini F, Alfaro ME (2013) A phylogenomic perspective on the radiation of ray-finned fishes based upon targeted sequencing of ultraconserved elements (UCEs). *PLoS ONE* 8: e65923, 1–7.

Flores S, Nassar JM, Quicke DLJ (2005) Reproductive phenology and pre-dispersal seed-feeding in *Protium tovarense* (Burseraceae), with a description of the first known phytophagous “*Bracon*” species (Hymenoptera: Braconidae: Braconinae). *Journal of Natural History* 39: 3663–3685.

Glazov EA, Pheasant M, McGraw EA, Bejerano G, Mattick JS (2005) Ultraconserved elements in insect genomes: A highly conserved intronic sequence implicated in the control of homothorax mRNA splicing. *Genome Research* 15: 800–808.

Gómez JF, Hernández Nieves M, F. Gayubo S, Nieves-Aldrey JL (2017) Terminal-instar larval systematics and biology of west European species of Ormyridae associated with insect galls (Hymenoptera, Chalcidoidea). *ZooKeys* 644: 51–88.

Goolsby JA, Burwell CJ, Makinson J, Driver F (2001) Investigation of the biology of the Hymenoptera associated with *Fergusonina* sp., a gall fly of *Melaleuca quinquenervia*, integrating molecular techniques. *Journal of Hymenoptera Research* 10: 163–180.

Grissell EE (1995) Toryminae (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae): a redefinition, generic classification and annotated world catalogue of species. *Memoirs on Entomology, International, Associated Publishers*.

Grissell EE (1999) An annotated catalog of world Megastigminae (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae). *American Entomological Institute* 31.

- Grissell EE (2006) A new species of *Megastigmus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae), galling seed capsules of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt (Myrtaceae) in South Africa and Australia. *African Entomology* 14: 87–94.
- Grissell EE, Desjardins CA (2002) A revision of *Bootania* Dalla Torre and recognition of *Macrodasyceras* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae). *Journal of Hymenoptera Research* 11: 279–311.
- Harris RS (2007) Improved pairwise alignment of genomic DNA. *The Pennsylvania State University* (dizertační práce).
- Heraty JM, Burks RA, Cruaud A, Gibson GAP, Liljeblad J, Munro J et al. (2013) A phylogenetic analysis of the megadiverse Chalcidoidea (Hymenoptera). *Cladistics* 29: 466–542.
- Heraty J, Ronquist F, Carpenter JM, Hawks D, Schulmeister S, Dowling AP et al. (2011) Evolution of the hymenopteran megaradiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 73–88.
- Hernández CM, Aquino DA, Cuello EM, Andorno AV, Botto EN (2015) Primera cita de *Megastigmus zebrinus* Grissell de Argentina (Hymenoptera: Torymidae) asociado a agallas de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 74: 75–77.
- Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868–877.
- Chavarría L, Hanson P, Marsh P, Shaw S (2009) A phytophagous braconid, *Allorhogas conostegia* sp. nov. (Hymenoptera: Braconidae), in the fruits of *Conostegia xalapensis* (Bonpl.) D. Don (Melastomataceae). *Journal of Natural History* 43: 2677–2689.
- Janšta P, Cruaud A, Delvare G, Genson G, Heraty J, Křížková B, Rasplus J-Y (2018) Torymidae (Hymenoptera, Chalcidoidea) revised: molecular phylogeny, circumscription and reclassification of the family with discussion of its biogeography and evolution of life-history traits. *Cladistics* 34: 627–651.
- Jarry M, Candau J-N, Roques A, Ycart B (1997) Impact of emigrating seed chalcid, *Megastigmus spermotrophus* Wachtl (Hymenoptera: Torymidae), on seed production in a Douglas-fir seed orchard in France and modelling of orchard invasion. *The Canadian Entomologist* 129: 7–19.
- Jousselin E, Rasplus J-Y, Kjellberg F (2001) Shift to mutualism in parasitic lineages of the fig/fig wasp interaction. *Oikos* 94: 287–294.
- Kamijo K (1962) A revision of the species of the Megastigminae occurring in Japan (Hymenoptera: Chalcidoidea) [Taxonomic Studies on the Torymidae of Japan, 1]. *Insecta Matsumurana* 25: 18–40.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S et al. (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Klein H, Hoffmann JH, Naser S, Dittrich-Schröder G (2015) Evidence that *Quadrastichodella nova* (Hymenoptera: Eulophidae) is the only gall inducer among four hymenopteran species associated with seed capsules of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) in South Africa. *African Entomology* 23: 207–223.
- Klopfstein S, Vilhelmsen L, Heraty JM, Sharkey M, Ronquist F (2013) The hymenopteran tree of life: Evidence from protein-coding genes and objectively aligned ribosomal data. *PLoS ONE* 8: e69344, 1–23.
- La Salle J (2005) Biology of gall inducers and evolution of gall induction in Chalcidoidea (Hymenoptera: Eulophidae, Eurytomidae, Pteromalidae, Tanaostigmatidae, Torymidae). *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods* 2: 507–537.
- Le NH, Nahrung HF, Morgan JA, Lawson SA (2020) Multivariate ratio analysis and DNA markers reveal a new Australian species and three synonymies in eucalypt-gall-associated *Megastigmus* (Hymenoptera: Megastigmidae). *Bulletin of Entomological Research*: 1-16.
- Lemmon AR, Emme SA, Lemmon EM (2012) Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Systematic Biology* 61: 727–744.
- de Macêdo MV, de Monteiro RF (1989) Seed predation by a braconid wasp, *Allorhogas* sp. (Hymenoptera). *Journal of the New York Entomological Society* 97: 358–362.
- Magoč T, Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27: 2957–2963.
- Makunin IV, Shloma VV, Stephen SJ, Pheasant M, Belyakin SN (2013) Comparison of ultra-conserved elements in drosophilids and vertebrates. *PLoS ONE* 8: e82362, 1-12.
- Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, Howard E, Shendure J, Turner DJ (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods* 7: 111–118.
- Matallana-Ramirez LP, Goode K, Bertone M, Janšta P, Burks R, Jetton R, Frampton J (2020) Assessing *Megastigmus specularis* (Hymenoptera: Megastigmidae) infestations in a Fraser fir (*Abies fraseri* (Pursh) Poir.) clonal seed orchard of the southern Appalachians. *Scandinavian Journal of Forest Research* (přijato do tisku).
- Mo J, Stevens MM (2014) Emergence patterns of adult citrus gall wasp, *Bruchophagus fellis* (Hymenoptera: Eurytomidae), and its key parasitoids in southern Australia. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17: 311–317.
- Munro JB, Heraty JM, Burks RA, Hawks D, Mottern J, Cruaud A, Rasplus J-Y, Janšta P (2011) A molecular phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS ONE* 6: e27023, 1–27.

- Narendran TC, Girish Kumar P, Vastrad AS (2010) Two new species of *Megastigmus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae) from India, with a revised key to Indian species. *Records of the Zoological Survey of India* 110: 1–6.
- Narendran TC, Raji B, Remadevi OK (2003) A review of the Oriental species of *Megastigmus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae). *Entomon* 28: 299–307.
- Narendran TC, Santhosh S, Sudheer K (2007) Biosystematics and biogeography of Oriental Chalcidoidea (Hymenoptera) associated with plant galls. *Oriental Insects* 41: 141–167.
- Narendran TC, Sudheer K, Das BK (2004) Description of a new species of *Mangostigmus* Boucek (Hymenoptera: Torymidae) parasitic on mango gall midge. *Journal of Current Sciences* 5: 501–504.
- Narendran TC, Vijayalakshmi M (2007) A new species of *Mangostigmus* Boucek (Hymenoptera: Torymidae) from Malabar, Kerala (India). *Proceedings of Zoological Society, Calcutta* 60: 7–10.
- Perioto NW, Lara RIR, Ferreira CS, Fernandes DRR, Pedroso EDC, Volpe HXL, Nais J, Correa LRB, Viel SR (2011) A new phytophagous *Bracon* Fabricius (Hymenoptera, Braconidae) associated with *Protium ovatum* Engl. (Burseraceae) fruits from Brazilian savannah. *Zootaxa* 3000: 59–65.
- Peters RS, Krogmann L, Mayer C, Donath A, Gunkel S, Meusemann K et al. (2017) Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology* 27: 1013–1018.
- Ramirez WB, Marsh PM (1996) A review of the genus *Psenobolus* (Hymenoptera: Braconidae) from Costa Rica, an inquiline fig wasp with brachypterous males, with descriptions of two new species. *Journal of Hymenoptera Research* 5: 64–72.
- Riek EF (1966) A new genus of gall-forming megastigmine Torymidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Australian Journal of Zoology* 14: 1199–1206.
- Ronquist F (1999) Phylogeny, classification and evolution of the Cynipoidea. *Zoologica Scripta* 28: 139–164.
- Ronquist F, Liljeblad J (2001) Evolution of the gall wasp-host plant association. *Evolution* 55: 2503–2522.
- Roques A, Auger-Rozenberg M-A, Boivin S (2006) A lack of native congeners may limit colonization of introduced conifers by indigenous insects in Europe. *Canadian Journal of Forest Research* 36: 299–313.
- Roques A, Copeland RS, Soldati L, Denux O, Auger-Rozenberg M-A (2016) *Megastigmus* seed chalcids (Hymenoptera, Torymidae) radiated much more on Angiosperms than previously considered. I- Description of 8 new species from Kenya, with a key to the females of Eastern and Southern Africa. *ZooKeys* 585: 51–124.
- Roques A, Skrzypczyńska M (2003) Seed-infesting chalcids of the genus *Megastigmus* Dalman, 1820 (Hymenoptera: Torymidae) native and introduced to the West Palearctic region: taxonomy, host specificity and distribution. *Journal of Natural History* 37: 127–238.

- Rouault G, Turgeon J, Candau J-N, Roques A, von Aderkas P (2004) Oviposition strategies of conifer seed chalcids in relation to host phenology. *Naturwissenschaften* 91: 472–480.
- Roux G, Roques A, Menu F (1997) Effect of temperature and photoperiod on diapause development in a Douglas fir seed chalcid, *Megastigmus spermotrophus*. *Oecologia* 111: 172–177.
- Ryu T, Seridi L, Ravasi T (2012) The evolution of ultraconserved elements with different phylogenetic origins. *BMC Evolutionary Biology* 236: 1–12.
- Scheffer SJ, Grissell EE (2003) Tracing the geographical origin of *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Torymidae): an African wasp feeding on a South American plant in North America. *Molecular Ecology* 12: 415–421.
- Sharkey MJ (2007) Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa* 1668: 521–548.
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K et al. (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research* 15: 1034–1050.
- Smith BT, Harvey MG, Faircloth BC, Glenn TC, Brumfield RT (2014) Target capture and massively parallel sequencing of ultraconserved elements for comparative studies at shallow evolutionary time scales. *Systematic Biology* 63: 83–95.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Stone GN, Hernandez-Lopez A, Nicholls JA, di Pierro E, Pujade-Villar J, Melika G, Cook JM (2009) Extreme host plant conservatism during at least 20 million years of host plant pursuit by oak gallwasps. *Evolution* 63: 854–869.
- Stöver BC, Müller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11: 7.
- Turgeon JJ, Roques A, de Groot P (1994) Insect fauna of coniferous seed cones: Diversity, host plant interactions, and management. *Annual Review of Entomology* 39: 179–212.
- Wheeler GS, Taylor GS, Gaskin JF, Purcell MF (2011) Ecology and management of sheoak (*Casuarina* spp.), an invader of coastal Florida, U.S.A. *Journal of Coastal Research* 27: 485–492.
- Whitfield JB (2003) Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera. *Advances in Parasitology, Elsevier*: 69–100.
- \*Xu Z, He J, Liu Z (1998) Description on a new species of Torymidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Entomotaxonomia* 20: 297–299.
- Yao Q, Huang D, Xiao H (2017) A taxonomic study of the genus *Bootania* Dalla Torre (Hymenoptera: Torymidae) from China, with description of one new species. *Oriental Insects* 51: 116–123.

Zaldivar-Riverón A, Belokobylskij SA, León-Regagnon V, Martínez JJ, Briceño R, Quicke DLJ (2007) A single origin of gall association in a group of parasitic wasps with disparate morphologies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 981–992.

Zaldivar-Riverón A, Martínez JJ, Belokobylskij SA, Pedraza-Lara C, Shaw SR, Hanson PE, Varela-Hernández F (2014) Systematics and evolution of gall formation in the plant-associated genera of the wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology* 39: 633–659.

Zhang YM, Williams JL, Lucky A (2019) Understanding UCEs: A comprehensive primer on using ultraconserved elements for arthropod phylogenomics. *Insect Systematics and Diversity* 3: 3, 1–12.

Zheng W-X, Zhang C-T (2008) Ultraconserved elements between the genomes of the plants *Arabidopsis thaliana* and rice. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 26: 1–8.

### Internetové zdroje a databáze

Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Dostupné na: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Bioinfo Genotoul, doi: 10.15454/1.5572369328961167E12.

Maddison WP, Maddison DR (2019) Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Verze 3.6, dostupné na: <http://www.mesquiteproject.org>.

Noyes JS (2020) Universal Chalcidoidea Database. World Wide Web electronic publication. Dostupné na: <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids> (zprístupněno březem 2020).

Zdroje obrázků k obrázku 26:

<https://www.hiclipart.com>.

<https://www.specialitytrees.com.au/collections/advanced-trees-a-focus-on-hakea-xcxix>,

[https://en.wikipedia.org/wiki/Pandanus\\_utilis#/media/File:Pandanusutilisfruit.JPG](https://en.wikipedia.org/wiki/Pandanus_utilis#/media/File:Pandanusutilisfruit.JPG),

Zdroje obrázků k obrázkům 27 a 28:

<https://www.hiclipart.com/free-transparent-background-png-clipart-mnjwi/download>

<https://imgbin.com/download-png/KM3VzGUA>

<https://imgbin.com/download-png/KqniVDHJ>

<https://imgbin.com/png/zpalcf8u/afro-eurasia-map-png>

[https://pngtree.com/freepng/australia-vector-map\\_4100126.html](https://pngtree.com/freepng/australia-vector-map_4100126.html)

\* Pozn.: Literatura označená hvězdičkou byla použita pouze v tabulce v Příloze 1.



## 9) Dodatky

### Seznam zkratek

°C	stupeň Celsia
μl	mikrolitr
μM	mikromolární
28 SD2 rDNA	velká ribosomální podjednotka 28S rDNA, segment D2
AHE	Anchored Hybrid Enrichment
CBGP	Centre de Biologie pour la Gestion des Populations
cm	centimetr
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB	elusion buffer, eluční pufr
GTRGAMMA	General Time Reversible model nukleotidových záměn
HCE(s)	Highly Conserved Element(s)
min	minuta
ml	mililitr
ML	Maximum Likelihood (maximální věrohodnost)
mm	milimetr
MP	Maximum Parsimony (maximální parsimonie)
MPS	Massive Parallel Sequencing (masivní paralelní sekvenování)
ng	nanogram
nM	nanomolární
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativní PCR
RAxML	Randomized Accelerated Maximum Likelihood
RNA	ribonukleová kyselina
UCE (s)	Ultra Conserved Element(s)
UMR AGAP	Unité Mixte de Recherche, Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales
s	sekunda
sp. gr.	species group (skupina druhů, druhový komplex)

### Seznam příloh

**Příloha I** – Seznam všech platných druhů a rodů čeledi Megastigmidae (včetně autora popisu, hostitelů, hostitelských rostlin, biologie a biogeografie).

**Příloha II** – Tabulka vzorků použitých pro přípravu knihoven s informacemi o sběru.

**Příloha III** – Tabulka vzorků použitých pro přípravu knihoven s informacemi o získaném množství DNA v jednotlivých krocích a dalšími doplňujícími informacemi.

**Příloha IV** – Tabulka vzorků izolovaných dříve v laboratoři v Montpellier s doplňujícími informacemi.